DUMITRU BUIUC
doctor în medicină
şef de lucrări

GABRIELA COMAN
doctor în medicină
asistent

Disciplina de Microbiologie,
Facultatea de Medicină,
I.M.F. Iaşi

Microbi

B A C T E R I O L O G I A   P R A C T I C A

UN GHID IN STUDIUL SI PRACTICA MEDICINII

Ediţia a VI-a

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI

1977

Ediţia I-a 1951
Ediţia II-a 1956
Ediţia III-a 1959
Ediţia IV-a 1964
Ediţia V-a 1974

PREFATA la ediţia a VI-a

Utilizarea raţională a laboratorului de microbiologie şi sero-imunologie clinică, ca instrument de investigaţie la dispoziţia medicului practician, este un atribut al competenţei profesionale.

Laboratorul nu este un auxiliar ci o parte integrantă, indispensabilă, a medicinii clinice şi a medicinii preventive. Acesta este sensul în care trebuie înţelese cuvintele lui Charles Richet:

„Ceux qui opposent le laboratoire à la clinique, n'ont jamais rien compris ni à l'un ni à l'autre"

Ediţia de faţă, prin conţinutul şi suita capitolelor sale, are în vedere programa analitică şi, mai ales, necesitatea îndrumării studentului în medicină pe calea înţelegerii raţionale a posibilităţilor pe care i le oferă laboratoarele de microbiologie clinică şi de microbiologie sanitară în activitatea curativă şi în cea profilactică.

Studentul, viitorul medic, trebuie să cunoască în final ce poate să ceară laboratoarelor de microbiologie şi sero-imunologie, cum şi cînd să le solicite şi cum să interpreteze datele pe care le obţine pe această cale.

Pornim de la ideea că studentul în medicină trebuie convins din primii ani că studiul medicinii nu începe şi nu se sfîrşeşte cu o disciplină sau alta, că un examen nu este decît o etapă spre studiul unor noi noţiuni sau a aceloraşi noţiuni la un nivel mai complex, superior, studiu pe care, progresiv, trebuie să se deprindă a-l efectua independent pornind de la problemele pe care i le ridică <u>activitatea de zi cu zi la patul bolnavului</u>. Tocmai de aceea am dat dezvoltare mai mare unor capitole incluzînd, dactilografiate cu caractere distincte, acele noţiuni facultativ de reţinut pentru studenţii anului II, dar asupra cărora studenţii din anii superiori vor putea reveni cu folos pe parcursul stagiilor clinice şi chiar în cursul primilor ani de practică medicală, indiferent de specialitatea aleasă.

Autorii consideră cartea de faţă ca o modestă contribuţie la ilustrarea practică a magistralelor

cursuri ale tov.prof. Eugenia Duca, promotor neobosit în şcoala medicală ieşeană a unei concepţii clare şi realiste asupra domeniului atît de spinos al Microbiologiei Clinice.

Iaşi 2 octombrie 1976

Dumitru Buiuc
Gabriela Coman

CUPRINS

1 STERILIZAREA

Steril, din punct de vedere microbiologic, înseamnă lipsit total de microbi.

Sterilizarea constă în omorîrea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor - patogene sau nepatogene, forme vegetative şi spori - dintr-o substanţă sau de pe suprafaţa unui obiect.

Manipularea produselor microbiene în scopul evidenţierii microbilor şi a identificării lor ş.a. sînt de neconceput în lipsa unei sterilizări eficiente a instrumentelor, a recipientelor, a mediilor de cultură.

Dar sterilizarea are nenumărate aplicaţii şi în activitatea medicală şi umană în general. Ea reprezintă o condiţie majoră a

(i) terapiei privind atît
- medicamentul, indiferent de forma sa, dar în special soluţiile injectabile,
cît şi
- întregul utilaj chirurgical, instrumentar, fire de sutură, comprese, pansamente, aerul sălii de operaţie, îmbrăcămintea chirurgului etc.;

(ii) profilaxiei infecţiei atît în condiţii de spital cît şi în condiţiile vieţii de toate zilele:

- sterilizarea produselor patologice provenite de la bolnavul infecţios;
- sterilizarea obiectelor contaminate folosite de bolnavul infecţios şi a încăperii în care s-a găsit acesta;
- noţiunea se extinde, în măsura posibilului, la sterilitatea alimentului, apei de băut, lenjeriei etc.

Pentru aceste motive am dat capitolului o amploare mai mare.

Sterilizarea se obţine prin:

(A) Agenţi fizici
   (1) căldură
      (a) căldură uscată
      (b) căldură umedă
   (2) filtrare
   (3) radiaţii
(B) Agenţi chimici: substanţe antimicrobiene.

Alegerea metodei de sterilizare este dictată de natura materialelor care urmează a fi sterilizate. Acestea, în condiţiile unei sterilizări eficiente, nu trebuie să se degradeze sub acţiunea agentului de sterilizare. Excepţie fac, bineînţeles, reziduurile în cazul cărora se urmăreşte exclusiv eficienţa sterilizării.

Metode de sterilizare

(1) Sterilizarea prin căldură este cel mai larg folosită în practica medicală.

(a) Sterilizarea prin căldură usoată.

(i) Sterilizarea prin ardere este rapidă şi are eficienţă absolută. Se pot steriliza prin ardere obiecte cu volum mic care se răcesc repede şi se întrebuinţează imediat după sterilizare.

a) Incălzirea la roşu: obiectul de sterilizat se arde în flacără (bec de gaz, lampă de spirt) pînă la roşu. Se sterilizează în acest mod firul, ansa şi spatula de platină (fig.1).

b) Flambarea: obiectul de sterilizat se trece prin flacără timp de cîteva secunde. Se sterilizează în acest mod capilarul pipetelor Pasteur, gura eprubetelor şi flacoanelor (sterile în interior), lame de sticlă, tija ansei şi spatulei (fig.2).

Aceste metode sînt contraindicate pentru sterilizarea altor instrumente metalice (ace de seringă din oţel, bisturie, pense, foarfeci etc.) deoarece le degradează.

c) Prin incinerare se pot steriliza reziduurile contaminate (pansamente, comprese, gunoiul menajer).

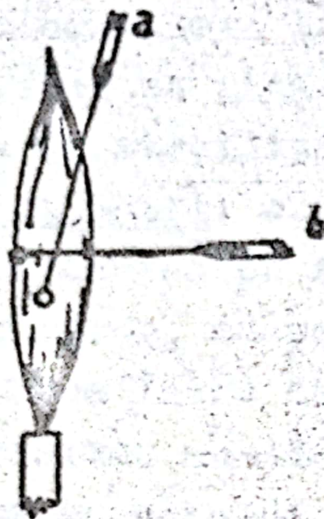


Fig.1 Sterilizarea ansei prin ardere la roşu
a) poziţie corectă,
b) poziţie incorectă

(ii) Sterilizarea prin aer cald. Este indicată pentru obiecte de sticlă (eprubete, flacoane, cutii Petri, pipete etc.), de porţelan (mojare, capsule), instrumentarul chirurgical metalic, seringile în întregime din sticlă (tip

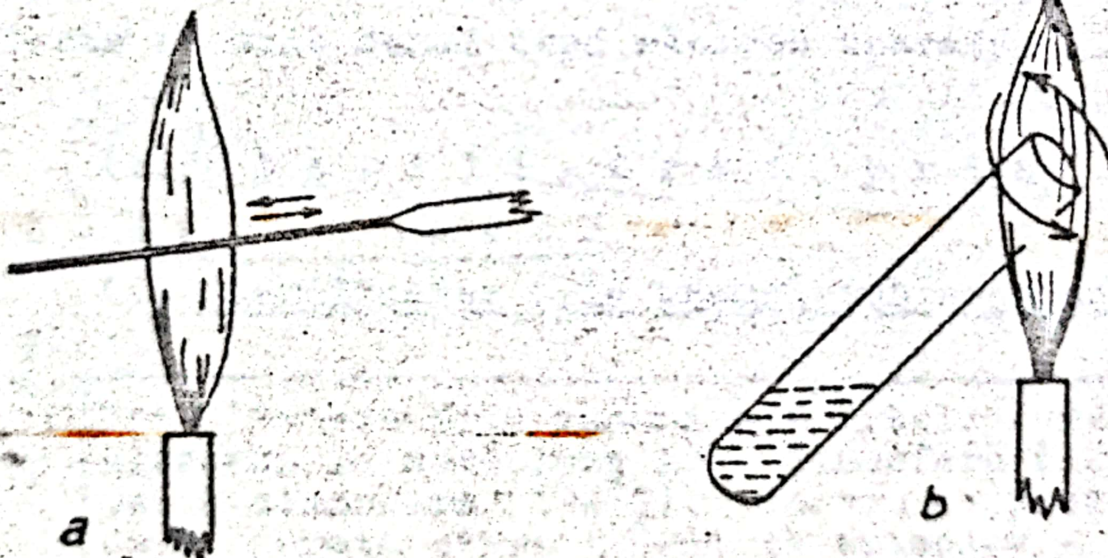


Fig.2 a) Sterilizarea prin flambare a capilarului pipetei Pasteur, b) sterilizarea prin flambare a gurii unei eprubete

Luer), unele pulberi, substanţe uleioase.

Este contraindicată pentru soluţii apoase, obiecte din cauciuc sau cu garnituri de cauciuc, ţesături, seringile din metal şi sticlă (Record), materialul contaminat din laborator etc., deoarece degradează aceste materiale.

Sterilizarea prin aer cald realizată în Poupinel timp de 1 oră la 180°C are eficienţă absolută.

Sterilizatorul cu aer cald (Poupinel) este o cutie, cilindrică sau paralelipipedică, cu pereţi dubli de tablă. Rezistenţe electrice, plasate la partea inferioară a aparatului, şi un termostat permit obţinerea şi menţinerea temperaturii de sterilizare. Un sistem de orificii permite circularea aerului cald în interiorul aparatului (previne stratificarea aerului încălzit) asigu-

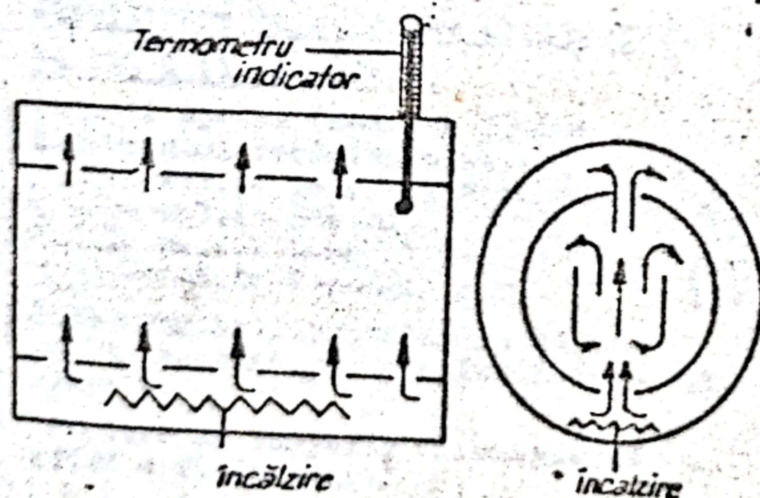


Fig.3 Prezentare schematică a unui sterilizator cilindric cu aer cald. Circulaţia aerului cald. a) Secţiune longitudinală, b) secţiune transversală

rînd uniformizarea temperaturii. In interior se găsesc rafturi de sită metalică pe care se aşează obiectele de sterilizat (fig.3).

Funcţionare: obiectele pregătite pentru sterilizare se aşează pe rafturile aparatului, fără a-l umple la refuz, cu precauţia de a nu atinge pereţii şi de a lăsa între obiecte mici spaţii care să permită circuitul nestînjenit al aerului cald. Se închide uşa aparatului. Se deschide orificiul de ventilaţie. Se face contactul electric şi se reglează pentru temperatura de 180°C. Din momentul în care se atinge această temperatură se marchează timpul. După o oră se întrerupe curentul. Obiectele sterilizate se scot numai după răcirea aparatului.

(b) Sterilizarea prin căldură umedă

(i) Sterilizarea prin vapori sub presiune

Sterilizarea prin vapori sub presiune se realizează în autoclave la 1 atmosferă (121°C) sau 2 atmosfere (134°C). Pentru o presiune dată, durata sterilizării la autoclav - timpul de autoclavare - depinde de natura, volumul şi modul de ambalare a materialului de sterilizat (vezi tabelul 1).

Este indicată pentru:

- obiecte din bumbac (lenjerie chirurgicală, tampoane, meşe, vată etc.);

Tabelul 1

Prezentare comparativă a parametrilor sterilizării prin aer cald şi vapori de apă sub presiune. Exemple selectate din practica medicală şi de laborator (adaptat după Schmidt/Naumann/Horsch, 1968; Cruikshank, 1965; Perkins, 1957)

Materialul şi volumul în care este supus sterilizării	Timpul*) de egalizare a temperaturii	Timpul*) de omorîre a microbilor	Timpul*) de sterilizare**)
Sterilizare la Poupinel la 180°C			
Sticlărie, instrumentar metalic în ambalaje cu volum redus	35	25	6o
Ibid. în ambalaje voluminoase; seringi Luer ambalate în tuburi; pulberi (în cutii Petri în strat mai subţire de o,5 cm şi nu mai mult de lo g/cutie)	65-95	25	9o-12o
Ulei de arahide (maximum 85% din volumul recipientului):			
- în fiole pînă la 2o ml	25	25	5o
- în flacoane de loo ml	45	25	7o
- în flacoane de 3oo ml	5o	25	75
Sterilizare în autoclav vertical la 121°C (1 atmosferă)			
Soluţii apoase (maximum 75-8o% din volumul recipientului):			
- vol. de lo ml în eprubete	o	18	18
- vol. de 5oo ml	2-7	18	2o-25
- vol. de looo ml	7-12	18	25-3o
- vol. de 2ooo ml	17-27	18	35-45
Instrumentar împachetat în hîrtie sau în containere metalice între-deschise	12	18	3o
Casolete cu lenjerie chirurgicală (fără a fi îndesată)	27	18	45
Sterilizare la autoclav orizontal cu prevacuum la 134°C (2 atm.)			
Casolete cu lenjerie chirurgicală (chiar îndesată)	1	3	4

*) Timpul măsurat în minute

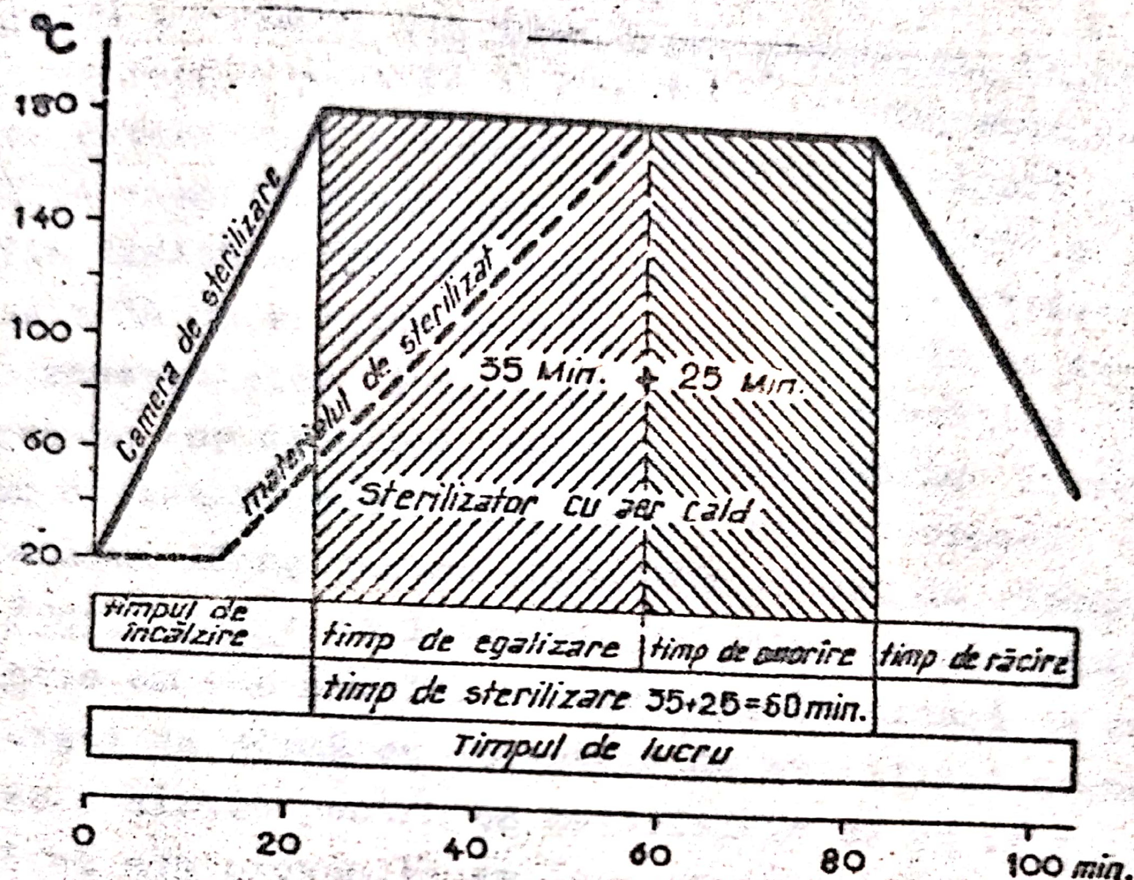
**) Măsurat din momentul în care temperatura camerei de sterilizare a atins temperatura selectată. Deci, pentru a obţine un material steril în stare de utilizare, la timpii consideraţi în tabel mai trebuie adăugat timpul de încălzire al aparatului, timpul de răcire şi uscare a materialelor (vezi fig.4).

- instrumentarul chirurgical metalic;
- instrumentar, aparate şi dispozitive din sticlă cu armături metalice, garnituri şi părţi din cauciuc (seringi Record, aparate de filtrare ş.a.);
- obiecte şi instrumente de cauciuc (mănuşi chirurgicale, sonde etc.);
- sticlărie de laborator cu destinaţii speciale (pentru culturi de celule etc.);
- soluţii;
- materialul contaminat din laborator.

Tabelul 1 şi fig.4 prezintă, comparativ, parametrii sterilizării prin aer cald şi prin vapori sub presiune.

Din tabelul 1 reiese că

- Timpul de omorîre al microbilor şi timpul de uniformizare a temperaturii sînt mai lungi în cazul sterilizării prin aer cald decît al sterilizării prin vapori sub presiune. In aer cald, unde căldura se propagă prin conductibilitate şi radiaţie, obiectele se încălzesc mai greu decît în autoclav unde căldura se propagă prin convecţie.
- Timpul de sterilizare în Poupinel la 180°C creşte peste 1 oră în cazul substanţelor care se încălzesc greu (uleiuri, pulberi), motiv pentru care aceste substanţe se sterilizează în volume mici şi în strat subţire.
- Timpul de sterilizare la autoclav la 121°C este de 45-5o min. pentru lenjeria chirurgicală şi



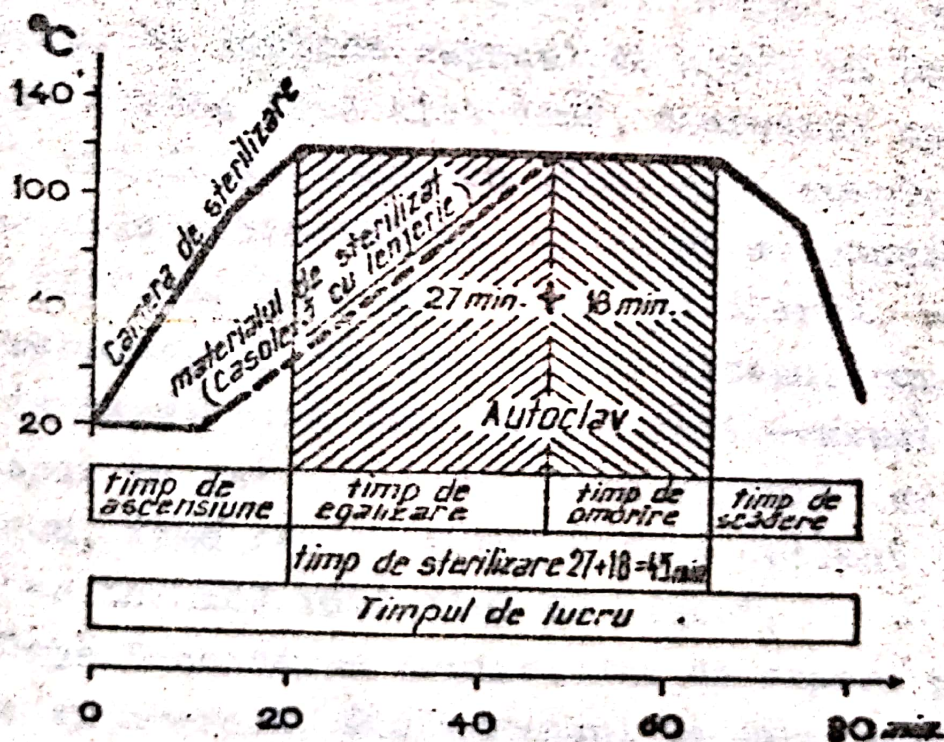


Fig.4 Reprezentare schematică a parametrilor sterilizării prin aer cald şi prin vapori sub presiune

de 2o-3o min.pentru volumele mici şi medii de soluţii.

> Timpul de omorîre a microbilor variază invers proporţional cu temperatura de sterilizare.
> Timpul de uniformizare a temperaturii variază direct proporţional cu volumul materialelor supuse sterilizării.

<u>Autoclavul</u> are ca piesă principală un cazan cu pereţi rezistenţi în interiorul căruia, după închiderea etanşă cu un capac masiv prevăzut cu buloane sau un sistem cabestan, vaporii de apă se pot comprima la presiunea necesară sterilizării.

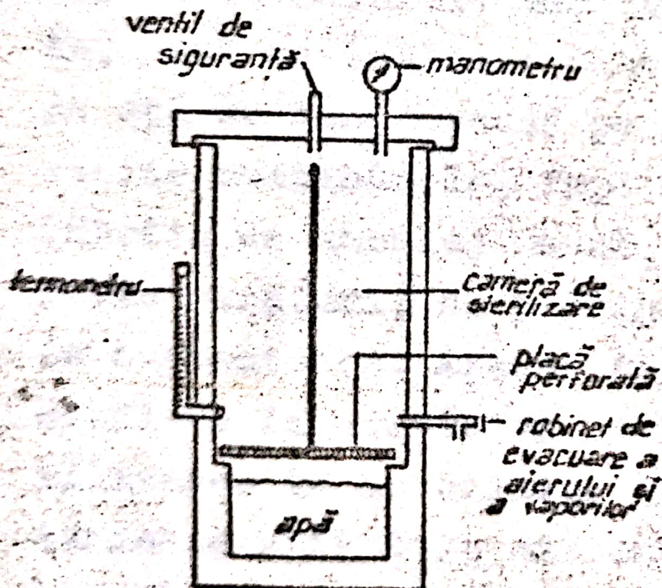


Fig.5 Secţiune schematică simplificată printr-un autoclav cu perete simplu,aparat indicat pentru sterilizări în laboratoare şi farmacii (după Schmidt/Naumann/Horsch, 1968)

<u>Autoclavele verticale</u>, după cum arată şi numele, au axul lung al cazanului de presiune dispus vertical.

<u>Autoclavul vertical cu perete simplu</u> (fig.5). La acest tip de autoclav vaporii provin prin încălzirea apei aflată în însuşi cazanul de presiune. Un manometru permite

controlul presiunii din interiorul cazanului. Un robinet de vapori pune în legătură interiorul cazanului cu exteriorul. O supapă de siguranţă asigură evacuarea vaporilor cînd presiunea lor depăşeşte o anumită limită de securitate. In interiorul cazanului se află un trepied metalic care serveşte ca suport materialelor introduse pentru sterilizare într-un coş de sîrmă. Cazanul este cuprins într-un manşon de tablă groasă care la partea inferioară formează un lăcaş pentru adaptarea sursei de căldură.

<u>Functionare</u>: se introduce în autoclav apă pînă la cîţiva cm sub nivelul suportului. Se aşează pe suport coşul de sîrmă cu obiectele de sterilizat acoperite cu o hîrtie pentru ca materialele să nu se umezească cu apa provenită de la condensarea vaporilor pe capac. Se închide capacul cu ajutorul buloanelor care se strîng două cîte două, diametral opus, în doi timpi, mai întîi uşor, cu mîna, apoi complet cu cheia. Se deschide robinetul de vapori şi se conectează sursa de căldură. Cînd apa începe să fiarbă, vaporii ies prin robinet, la început în jet discontinuu, întrerupt de aerul care este concomitent evacuat din aparat, apoi în jet continuu. Cînd vaporii ies în jet continuu, semn că tot aerul a fost evacuat din autoclav, se închide robinetul de vapori.

După închiderea robinetului de vapori presiunea începe să crească. Din momentul în care presiunea a-

tinge valoarea aleasă (1 sau 2 atmosfere), se reglează sursa de căldură pentru a menţine presiunea la acest nivel pentru timpul indicat. La terminarea sterilizării, se întrerupe sursa de căldură. Autoclavul nu se deschide decît după ce presiunea a coborît la zero şi înainte de a se răci. Se deschide robinetul de vapori, apoi capacul. Se scot materialele.

Dacă se deschide robinetul de vapori sau capacul înainte de a fi coborît presiunea la zero, temperatura în interiorul autoclavului fiind încă peste 100°C, lichidele vor intra brusc în fierbere, vor umezi dopurile sau chiar vor ieşi din recipiente. Dacă se întîrzie deschiderea aparatului, vaporii de apă se condensează pe materialele sterilizate şi răcite umezindu-le, fapt ce compromite sterilizarea. (Hîrtia de ambalaj umedă, chiar dacă este în mai multe straturi, nu previne pătrunderea bacteriilor de contaminare. Aşadar este esenţial ca obiectele ambalate în hîrtie să nu vină în contact, după sterilizarea la autoclavul vertical, cu suprafeţe contaminate atît timp cît ambalajul lor nu este perfect uscat).

Autoclavul vertical cu perete simplu se utilizează în laboratoare şi farmacii fiind indicat pentru sterilizarea mediilor de cultură în microbiologie şi, în general, pentru sterilizarea soluţiilor.

Poate fi folosit şi pentru sterilizarea celorlalte materiale medicale şi chirurgicale, dar prezintă dezavantajul unei uscări dificile a materialului sterilizat, mai ales a lenjeriei chirurgicale.

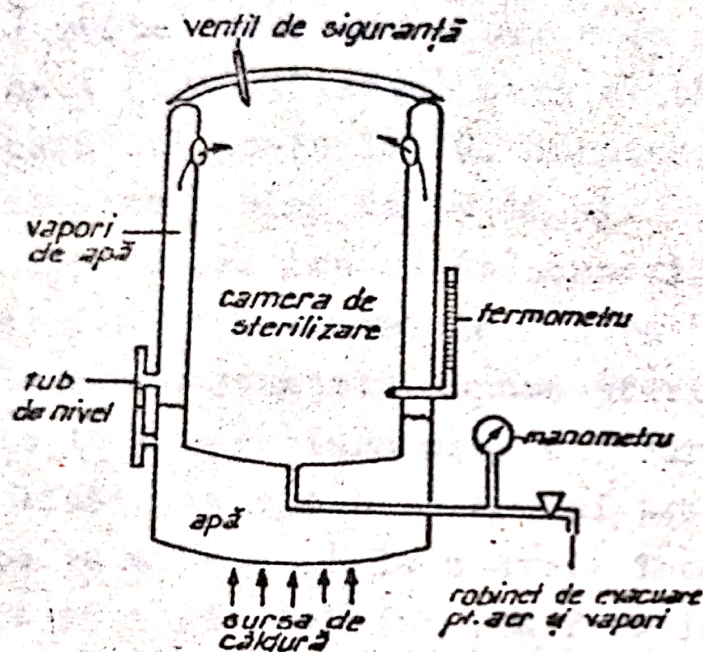


Fig.6 Secţiune schematică simplificată printr-un autoclav vertical cu perete dublu. Aparat indicat pentru sterilizarea materialului chirurgical (după Schmidt/Naumann/Horsch, 1968)

<u>Autoclavul vertical cu perete dublu</u> (fig.6). La acest tip de autoclav vaporii de apă provin dintr-o sursă plasată sub camera de sterilizare şi în afara ei. Sursa de vapori comunică cu camera de sterilizare pe tot parcursul operaţiei. Acest autoclav este indicat pentru sterilizarea materialului chirurgical: materialele după sterilizare nu mai vin în contact direct cu vaporii de apă şi se usucă mai rapid.

La <u>autoclavul orizontal</u>, după cum arată şi numele, axul lung al cazanului de presiune este dispus orizontal (fig.7).

Vaporii provin dintr-o sursă separată şi sînt admişi în cazan unde realizează presiunea dorită. La autoclavele moderne, aerul este îndepărtat printr-o pompă de vid, ceea ce asigură penetraţia rapidă şi perfectă a vaporilor de apă în porozităţile ambalajelor şi materialelor sterilizate. După sterilizare vaporii de apă sînt îndepărtaţi. Vidul astfel creat asigură uscarea perfectă a materialelor sterilizate.

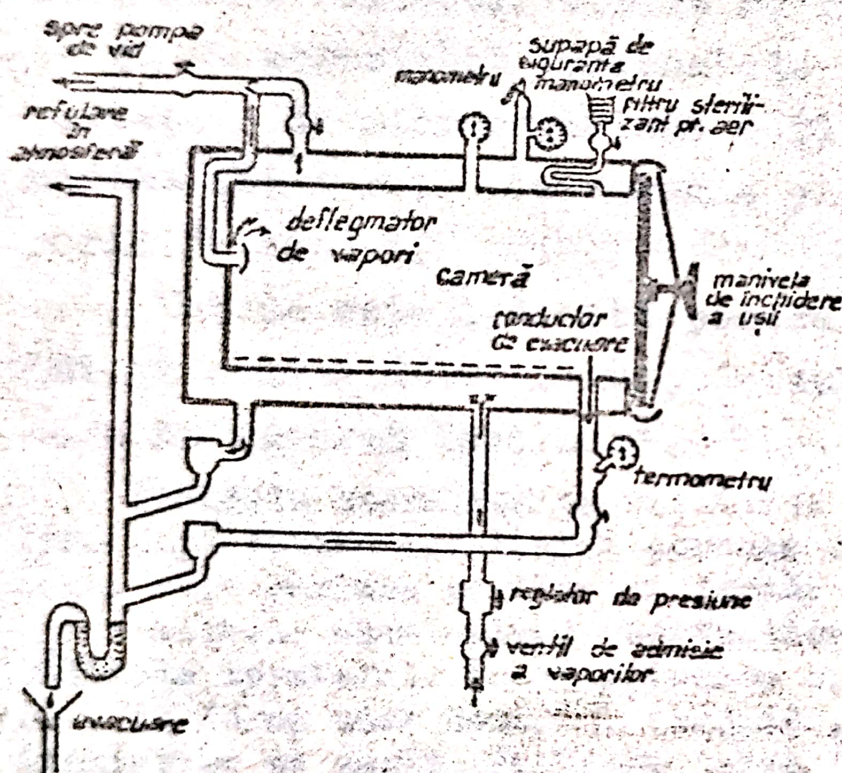


Fig.7 Secţiune schematică printr-un autoclav orizontal cu perete dublu prevăzut cu sisteme de prevacuum, îndepărtare a condensului şi uscare a materialelor prin vacuum (după Cruickshank, 1965)

Autoclavele orizontale cu prevacuum sînt indicate pentru sterilizarea materialelor chirurgicale (lenjerie, instrumentar etc.). Permit uscarea perfectă şi rapidă a obiectelor sterilizate. Absenţa aerului în timpul încălzirii elimină riscul degradării materialelor sub acţiunea oxigenului în condiţiile căldurii umede. Sînt destinate cu precădere staţiilor centrale de sterilizare din spitale, blocurilor operatorii. La aceste

aparate nu se sterilizează soluţii.

(ii) Sterilizarea fracţionată. După expunerea 1/2-1 oră la 100°C căldură umedă sporii unor bacterii supravieţuiesc*) Pentru sterilizarea substanţelor termolabile (alimente, medii de cultură, medicamente) se poate recurge la sterilizarea fracţionată (tyndallizare) care evită încălzirea la temperaturi peste 100°C. Substanţele de sterilizat se încălzesc timp de 30-60 min. trei zile succesiv la temperatura impusă de compoziţia lor (minimum 60-65°C). In intervalele dintre încălziri recipientele cu substanţele supuse sterilizării sînt menţinute la temperatura camerei. Formele vegetative germinate din sporii eventual prezenţi vor fi distruse la a doua şi la a treia încălzire. Se înţelege de aici că sterilizarea fracţionată este indicată numai pentru medii de cultură, alimente sau medicamente care permit germinarea sporilor în inter-

*) Aşadar fierberea nu este o metodă de sterilizare în sensul definiţiei date. Asigurînd în interval de 1/2 oră distrugerea tuturor microorganismelor în formă vegetativă şi a sporilor unor bacterii, fierberea îşi găseşte însă indicaţii definite în lupta contra infecţiei: distrugerea microbilor patogeni din apa de băut şi alimente, „sterilizarea" instrumentarului de mică chirurgie în situaţii de urgenţă, metodă de conservare a alimentelor pentru intervale limitate, „sterilizarea" lenjeriei ş.a. Aceste indicaţii ca şi limitele lor trebuie cunoscute de orice medic. Asupra lor se va reveni şi insista în cursul stagiului de epidemiologie.

valul dintre încălziri.

Sterilizarea fracţionată se realizează în autoclav la vapori fluenţi (robinetul de vapori deschis) sau la baia de apă.

(2) <u>Sterilizarea prin filtrare</u>

Filtrarea este trecerea unui fluid printr-un corp poros (filtru). Utilizînd filtre din materiale şi cu porozităţi convenabile se poate obţine debarasarea de microorganisme a fluidului filtrat, acestea fiind reţinute mecanic şi electrostatic în porii filtrului.

Metoda este indicată pentru sterilizarea aerului şi a lichidelor (medii de cultură, medicamente) care nu suportă încălziri.

Filtrele sterilizante utilizate în bacteriologie diferă după natura substanţei poroase din care sînt fabricate, după mărimea porilor şi formă:

Filtrele Chamberland (confecţionate din porţelan) şi filtrele Berckefeld (confecţionate din pămînt de infuzorii) au forma unor luminări (bujii) goale pe dinăuntru şi închise la un capăt. Filtrele Seitz (confecţionate din azbest impregnat cu caolin) au forma unor plăci filtrante. Filtrele Schott (confecţionate din sticlă poroasă) au forma unor plăci filtrante montate într-o pîlnie de sticlă. Fiecare filtru poartă un indicator al porozităţii.

Filtrarea se face prin aspiraţie sau prin presiune pozitivă. In acest scop filtrele sînt adaptate la diferite dispozitive de filtrare. Schematic, un asemenea dispozitiv se compune dintr-o pîlnie prin intermediul căreia se adaptează filtrul la un recipient de colectare a filtratului steril şi o pompă care creează presiunea negati-

vă sau pozitivă necesară (fig.8).

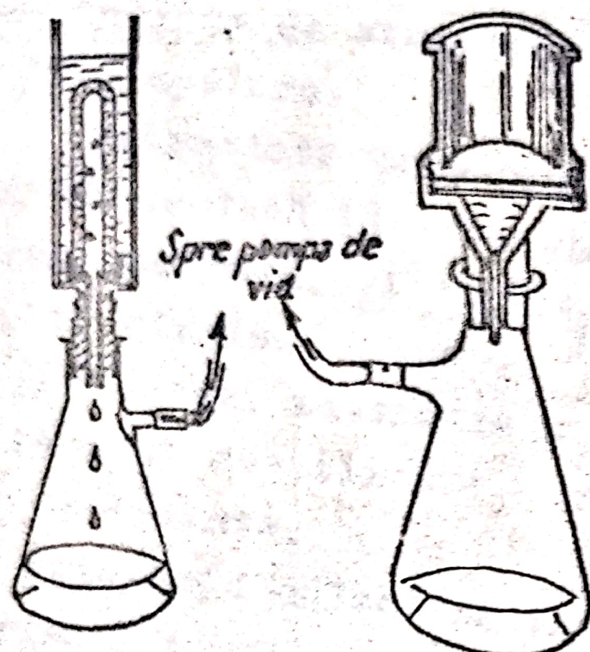


Fig.8 Dispozitive de filtrare prin presiune negativă. A-bujie filtrantă (Chamberlain sau Berckefeld); B-filtru Seitz.

Inainte de folosire, filtrul gata montat la recipientul de colectare a lichidului este sterilizat prin autoclavare.

(3) <u>Sterilizarea prin radiații</u>

<u>Radiațiile ultraviolete</u> avînd o penetrabilitate redusă indicațiile lor ca agent sterilizant se restrîng la sterilizarea aerului și suprafețelor de lucru în boxe sterile, săli de operație (de obicei în asociație cu agenți chimici sub formă de aerosoli, vapori).

<u>Razele gama</u> se utilizează pentru sterilizarea industrială a instrumentarului medical dispozabil (seringi, flacoane etc.), a unor medicamente ş.a.

(4) <u>Sterilizarea prin ultrasunete</u> are la bază fenomenul de cavitație care se produce la propagarea undelor ultrasonore printr-un mediu apos. Ultrasunetele pot fi utilizate în practica medicală pentru curățarea și sterilizarea instrumentarului stomatologic și de mică chirurgie (ultrasonare în băi de detergenți).

Controlul eficienţei sterilizării

Pentru controlul eficienţei sterilizării prin aer cald şi vapori sub presiune se folosesc indicatori fizici, chimici şi biologici.

(1) Indicatori fizici: termografe etc.

(2) Indicatori chimici

Se folosesc substanţe al căror punct de fuziune este la o temperatură apropiată de cea la care se face sterilizarea. De exemplu, floarea de sulf la 115°C, acidul benzoic la 121°C; zaharoza care caramelizează la 170°C etc. Fiole conţinînd aceste substanţe se repartizează la diferite nivele în incinta de sterilizare. Dezavantajul acestor indicatori este că nu dau nici o indicaţie asupra timpului cît s-a menţinut temperatura de fuziune.

(3) Indicatori biologici

Tuburi conţinînd fire de bumbac impregnate cu spori bacterieni şi uscate se plasează la diferite nivele în incinta de sterilizare. După sterilizare se testează viabilitatea sporilor prin însămînţarea lor în medii de cultură adecvate. Sînt indicatori simpli şi de mare fidelitate.

Pregătirea materialului pentru sterilizare

Curăţirea şi spălarea. Atît materialele de laborator (sticlărie, filtre etc.) cît şi instrumentarul şi materialele chirurgicale, sonde, seringi

etc. înainte de sterilizare trebuie perfect curăţa-te prin spălare.

Instrumentarul murdărit cu sînge este contaminat, chiar dacă intervenţia s-a făcut la o persoană aparent normală, şi expune personalul la riscul hepatitei virale.

De aceea, materialele ieşite din lucru contaminate sînt sterilizate sau dezinfectate şi înainte de a fi spălate.

- Sticlăria colectată în găleţi speciale pentru materialul contaminat se sterilizează la autoclav la 134°C; pipetele sînt menţinute 24 ore în amestec sulfo-cromic.

- Instrumentarul metalic, seringile şi acele sînt supuse dezinfecţiei cu un agent chimic puţin afectat de prezenţa substanţelor organice: un compus de fenol (lyzol 3%, contact 1-2 ore, ş.a.) sau glutaraldehidă 2% (contact 15-3o min.). Urmează periajul într-o soluţie 1-2% de detergenţi (Dero, Perlan) în apă caldă; în final urmele de substanţe chimice sînt îndepărtate prin spălare la jet abundent de apă. Pentru curăţarea acelor se va utiliza mandrenul.

In lipsa dezinfectanţilor amintiţi se va proceda astfel: instrumentarul şi seringile murdărite cu sînge sînt scufundate 15-3o min. într-o baie cu sol. de amoniac 1-2% pentru îndepărtarea sîngelui din anfractuozităţile unde periajul este mai puţin eficient. După aceasta urmează periajul în baia cu soluţia caldă de detergent şi spălarea în cîteva băi cu

apă curată pentru îndepărtarea urmelor de substanțe chimice. Obligator, în final toate aceste băi de spălare vor fi inactivate (fierbere 3o min.sau adăugare de cloramină în concentrație finală de 5% ori hipoclorit de Na pentru a asigura în final lo cm^3 Cl/litru).

Pe tot parcursul acestor operații personalul va purta mănuși de cauciuc și halat de protecție și va evita formarea de aerosoli virtual contaminanți.

Prezervarea sterilității materialului în intervalul sterilizare-întrebuințare se face prin diferite procedee care se aleg în funcție de natura materialului și metoda de sterilizare.

Eprubetele și flacoanele, la care ne interesează păstrarea sterilității suprafeței interne și a conținutului, se pun la sterilizat prevăzute cu dopuri de vată și tifon, protejate cu capișon de hîrtie sau foiță de aluminiu.

Tuburile pentru pipete Pasteur se sterilizează



Fig.9 Tub pentru pipete Pasteur pregătit în vederea sterilizării

cu extremitățile înfundate cu vată (fig.9).

Pipetele gradate se sterilizează cu filtru de vată la extremitatea care se introduce în gură şi învelite individual în benzi de hîrtie sau grupate în tuburi de tablă cu capac (fig.lo).



Fig.lo Pipete gradate pregătite pentru sterilizare grupate într-un tub de tablă cu capac

Plăcile Petri se sterilizează învelite individual sau grupate în hîrtie. Mojarele şi pistilele lor se învelesc separat în hîrtie (fig.11)

Instrumentele chirurgicale metalice se sterilizează la Poupinel în cutii de tablă

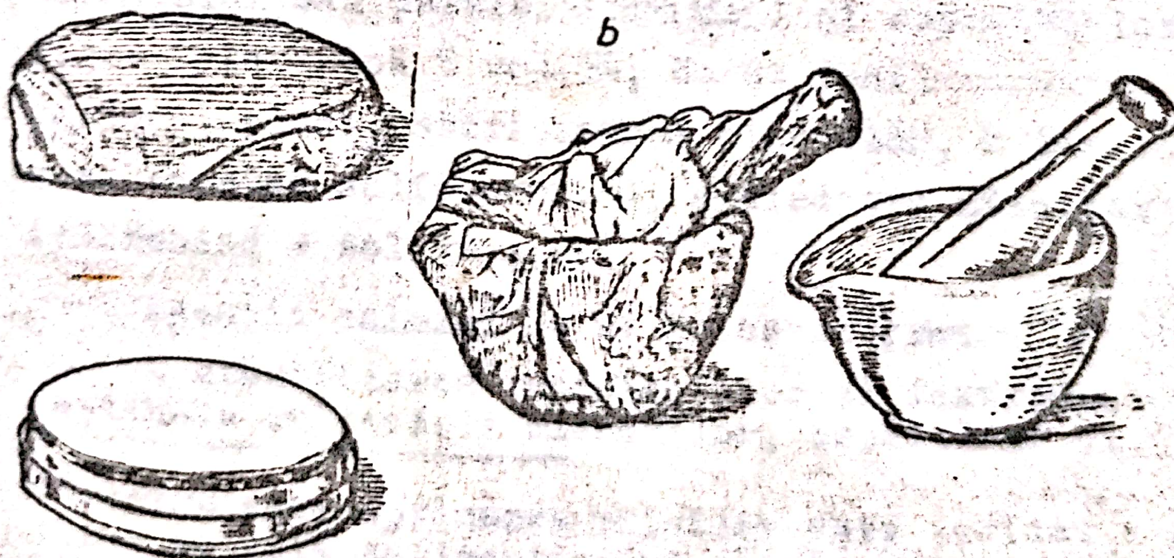


Fig.11 Cutie Petri (a) şi mojar (b): împachetate în vederea sterilizării

cu capac.

Sondele de cauciuc şi material plastic, instrumentarul destinat endoscopiei se sterilizează în casolete speciale ale căror orificii se obturează la scoaterea lor din dulapul de sterilizare (formolizare, sterilizare cu oxid de etilen).

Imbrăcămintea chirurgicală, cîmpurile operatorii, tampoanele, meşele, instrumentarul chirurgical etc. se sterilizează la autoclav în casolete (cutii de tablă inoxidabilă prevăzute cu capac şi orificii care permit pătrunderea vaporilor de apă în cursul autoclavării şi care se obturează la scoaterea din autoclav) (fig.12).



Fig.12 Casoletă

Seringile Record se sterilizează în casolete la autoclav. Se sterilizează demontate, fiecare seringă alături de pistonul ei în cutie proprie pentru a evita schimbarea pistoanelor între seringi. Acele se sterilizează alături de seringă, în aceeaşi cutie.

Seringile Luer se sterilizează montate şi împachetate în celofan sau hîrtie. Acele se sterilizează separat introduse în tuburi de sticlă de mărime corespunzătoare şi învelite individual sau grupate în hîrtie. Pentru destinaţii speciale (hemocultură, de exemplu) seringile Luer se sterilizează cu acul mon-

tat şi introduse într-un tub de sticlă astupat cu dop de vată (fig.13).

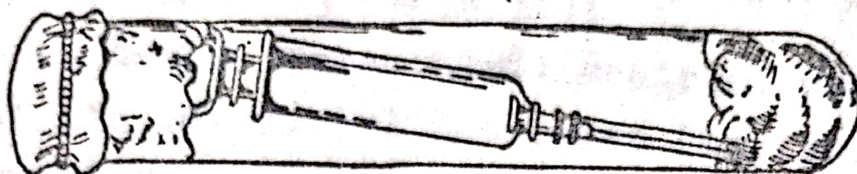


Fig.13 Seringă Luer pregătită pentru sterilizarea la Poupinel

Utilizarea agenţilor chimici în antisepsie, dezinfecţie şi în laboratorul de microbiologie.

In laboratorul de microbiologie aceste substanţe îşi găsesc aplicaţii limitate la prepararea unor medii de cultură selective, dezinfecţia încăperilor (vapori de formaldehidă rezultaţi prin încălzirea formolului sau paraformaldehidei) şi suprafeţelor de lucru (cloramină B sol.5%, borat fenil-mercuric sol. 1/25oo-1/5ooo), sterilizarea pipetelor, a lamelor ş.a.(amestec sulfo-cromic), antisepsia mîinilor.) (cloramină B sol.1% ş.a.).

Agenţii chimici nu se folosesc pentru

- sterilizarea recipientelor şi instrumentelor destinate cultivării microbilor, recoltării şi

.) Pentru antiseptizarea mîinilor este indicat a se turna soluţia antiseptică pe mîini; introducerea mîinilor în recipientul cu soluţie antiseptică este contraindicată deoarece urmele de substanţe organice care rămîn de pe mîini inactivează progresiv antisepticul.

transportului probelor pentru analize microbiologice deoarece urmele de dezinfectant îşi exercită acţiunea nocivă asupra microorganismelor cercetate;

- sterilizarea instrumentarului chirurgical, stomatologic, acelor şi seringilor deoarece au penetrabilitate insuficientă iar virusurile hepatitice (transmisibile parenteral), sporii bacterieni şi bacilul tuberculozei sînt deosebit de rezistenţi la acţiunea multor dezinfectante în concentraţiile lor uzuale, mai ales în prezenţa urmelor de substanţe organice.

Prin importanţa lor, antisepticele şi dezinfectantele depăşesc cu mult sfera laboratorului de microbiologie avînd o largă aplicare în chirurgie, în practica epidemiologică, igiena comunală şi a locuinţei. De aceea, asupra acestei probleme se va reveni în cursul stagiilor şi lucrărilor practice la aceste discipline.

<u>Metodica lucrului aseptic în laboratorul de microbiologie</u> (în aceeaşi măsură aplicabilă în laboratorul de seroimunologie şi biochimie clinică).

Obiectivele urmărite sînt:

- evitarea contaminării materialului manipulat cu microbi din mediul exterior (praf din aer, microbi de pe diferite suprafeţe etc.) sau provenind

de la manipulator (picături Flügge, microbi de pe tegumentele mîinii, păr ş.a.);

- evitarea contaminării mediului exterior cu microbi din materialul manipulat (manipularea culturilor microbiene, a produselor patologice etc.).

Se lucrează la adăpost de curenţi de aer. Cînd este cazul se lucrează în încăperi speciale în care aerul şi suprafeţele de lucru sînt sterilizate periodic (săli de operaţie, boxe sterile) şi se poartă îmbrăcăminte specială sterilă (intervenţii chirurgicale, manipulări în industria medicamentelor): bonetă, mască, halat, mănuşi sau chiar combinezon pentru lucru steril.

Materialele şi instrumentele chirurgicale, seringile ş.a. se manipulează la scoaterea din cutii, casolete sau în timpul montării cu ajutorul unei pense sterile (pensa se menţine într-o soluţie dezinfectantă, de exemplu lizol 3%).

Manipularea în condiţii aseptice a produselor microbiene (culturi, produse patologice etc.) (fig.14)

In cursul manipulărilor operatorul nu vorbeşte, poartă bonetă care strînge părul, eventual mască; uşile şi ferestrele sînt închise.

(i) Instrumentul cu care se face manipularea, sterilizat în prealabil (pipete gradate, seringi) sau sterilizat în momentul utilizării (ansa, capi-

larul pipetei Pasteur), se ţine în mîna dreaptă.


Fig.14 Etape succesive ale unei manipulări aseptice

Oricare ar fi, instrumentul se ţine în mînă cît mai aproape de extremitatea opusă celei care se introduce în recipient. Ansa se ţine ca un creion. Pipetele se ţin între police şi medius cu indexul aplicat pe orificiul astupat cu vată.

(ii) Recipientul din care se prelevă sau în care urmează a fi depus materialul manipulat (cultură microbiană, substanţă sterilă etc.) se ţine de extremitatea inferioară în mîna stîngă în aşa fel încît conţinutul şi traiectul instrumentului de manipulare să poată fi controlat permanent cu vederea.

(iii) Se scoate dopul recipientului cuprinzîndu-l între auricular şi palma mîinii drepte. Cît timp recipientele sînt fără dop se vor menţine înclinate pentru a evita depunerea în interiorul lor a particulelor de praf din atmosferă.

(iv) Se sterilizează prin flambare gîtul şi gura recipentului (se roteşte pe loc în flacără timp de cîteva secunde).

(v) Se introduce instrumentul şi se face prelevarea sau depunerea materialului în recipient după care se retrage cu grijă pentru a evita atingerea pereţilor şi mai ales a gurii şi gîtului recipientului (fig.15).

(vi) Se flambează din nou gura şi gîtul recipientului. Se introduce dopul.

(vii) Se sterilizează ansa cu precauţia de a nu introduce brusc bucla în flacără. Urmele de lichid

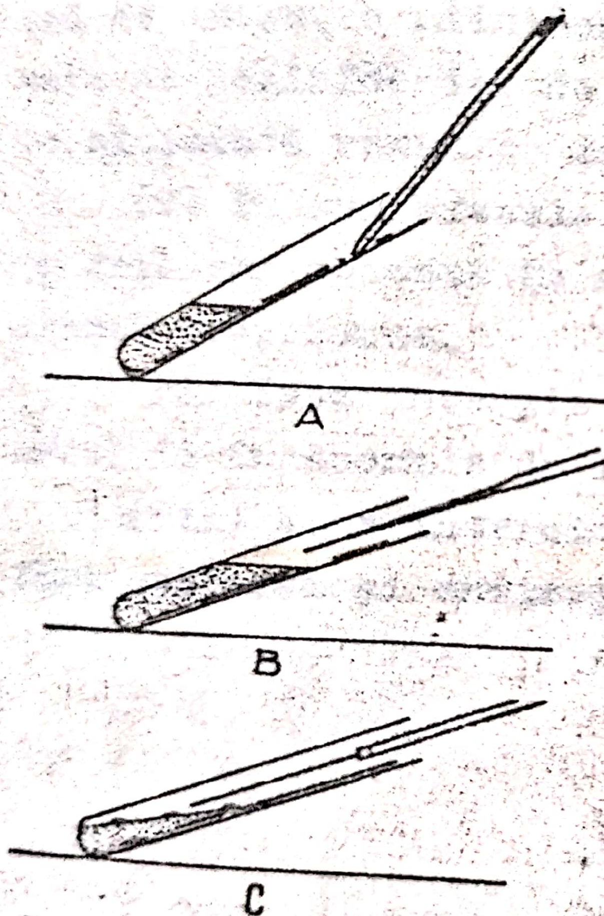


Fig.15 Etape ale unei manipulări aseptice: A-pipetarea unui volum determinat cu pipeta gradată; B-pipetarea cu pipeta Pasteur; C-prelevarea cu ansa.

de pe ansă pot intra brusc în fierbere stropind şi contaminînd suprafeţele din jur. Se trece ansa de cîteva ori succesiv prin flacără după care se încălzesc la roşu bucla şi firul pe toată lungimea. Pipetele se depun în cilindrul pentru pipete infecte. După manipulare, pipetele nu se sterilizează niciodată prin flambare.

Toate manipulările aseptice se fac sub controlul vederii.

> Principiile lucrului aseptic trebuie extinse şi respectate cu stricteţe în activitatea spitalicească, indiferent de profilul secţiei, fiind singurele capabile să prevină şi să limiteze intercontaminările în spitale (bolnav-bolnav, personal medical-bolnav).

Metodica lucrului aseptic în spitale, bazată pe aceleaşi principii, va fi însuşită cu ocazia stagiilor clinice.

<u>Precauţii speciale în cursul activităţii în laboratorul de microbiologie</u>

(i) In laborator se lucrează cu îmbrăcăminte de protecţie (halat, bonetă şi la nevoie mască, mănuşi şi ochelari de protecţie). Halatul de protecţie nu se supune variaţiilor modei: nu există „minihalate" protectoare contra microbilor.

(ii) Nu se părăseşte laboratorul cu îmbrăcămintea de lucru.

(iii) Se lucrează cu cea mai mare atenţie, numai deasupra mesei de lucru şi numai după ce regulile lucrului aseptic au fost foarte bine însuşite.

(iv) Dacă se produce o contaminare (a suprafeţei de lucru, a mîinilor etc.) se iau imediat măsuri de dezinfecţie; de pe masa de lucru nu lipseşte niciodată vasul cu dezinfectant.

(v) Pe suprafeţele de lucru se exclude prezenţa oricăror obiecte în afara celor cu care se lucrează propriuzis.

(vi) Este interzis consumul de alimente şi fumatul în încăperile de lucru.

(vii) Este interzis a părăsi masa de lucru fără spălarea şi antiseptizarea mîinilor.

./.

A. METODE DE EVIDENTIERE A BACTERIILOR

Bacteriile pot fi evidenţiate prin

- examen microscopic,
- izolare i n v i t r o pe medii de cultură,
- izolare i n v i v o pe animale specific sensibile.

In studiul bacteriilor cele 2 metode, examenul microscopic şi izolarea, nu se exclud ci se completează reciproc.

2) EVIDENTIEREA BACTERIILOR PRIN EXAMEN MICROSCOPIC. CARACTERE MORFOLOGICE SI COLORABILITATE.

Bacteriile pot fi văzute numai cu ajutorul microscoapelor. Ele se urmăresc în produse patologice (puroi, lichid cefalo-rahidian, spută etc.) şi în culturi, fie în stare vie (preparate umede necolorate), fie după prealabilă fixare şi colorare (preparate colorate).

Pentru necesităţile practicii curente de evidenţiere şi identificare a bacteriilor, utilizarea microscopului optic este suficientă.

(1) Preparate microscopice colorate

(i) Efectuarea frotiului

Prin frotiu se înţelege materialul microbian (produs patologic, cultură microbiană) etalat în strat subţire pe suprafaţa unei lame de microscop în vederea examenului microscopic.

Pentru efectuarea frotiurilor se folosesc lame de microscop curate şi degresate care se marchează, la una din extremităţi, cu indicativul materialului microbian ce urmează a fi etalat.

Efectuarea unui frotiu cuprinde 3 timpi:

- E t a l a r e a : o ansă din produs patologic fluid sau cultură bacteriană în mediu lichid

este întinsă în strat subţire şi uniform pe o suprafaţă de 1-2 cmp în centrul lamei, fără a atinge marginile. Similar, o secţiune dintr-o colonie (de pe geloză înclinată sau din cultura pe o placă Petri), prelevată cu acul, poate fi suspensionată într-o ansă de ser fiziologic depusă în centrul lamei.

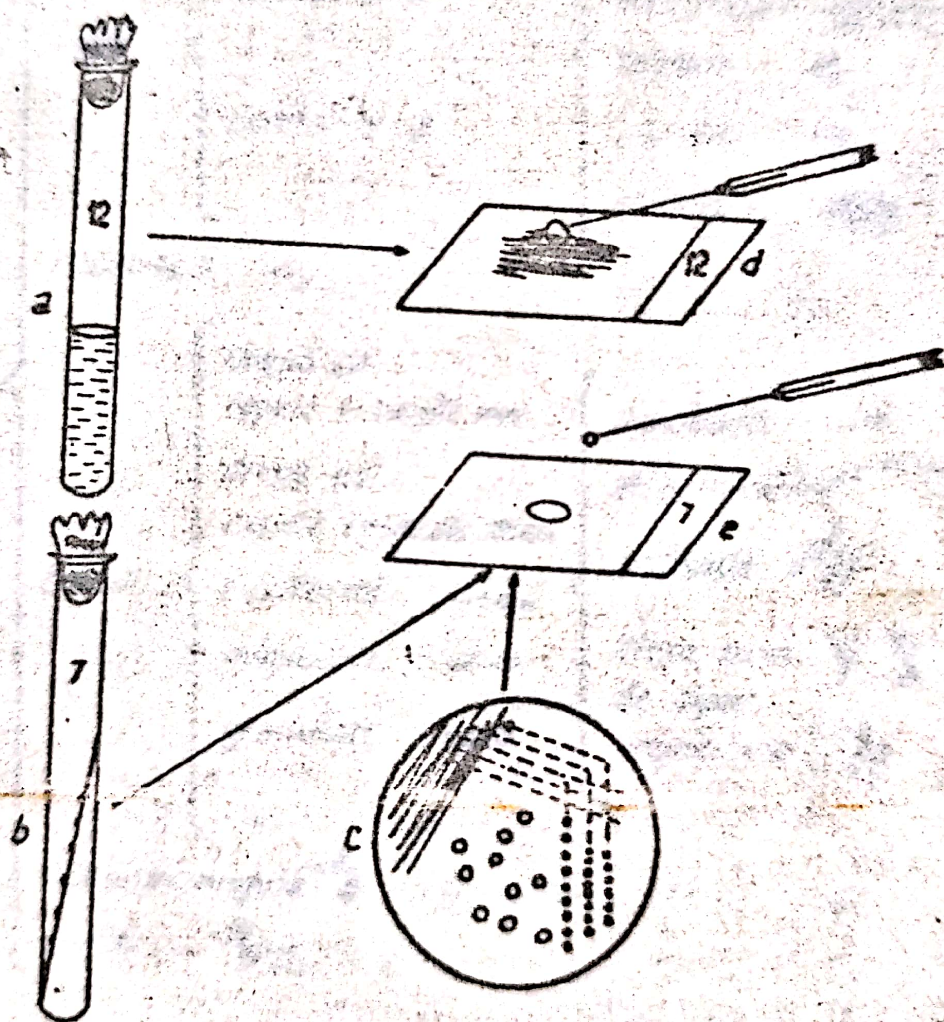


Fig.16 Efectuarea frotiurilor din culturi bacteriene. a) cultură în mediu lichid; b) cultură pe geloză înclinată; c) cultură pe placă cu geloză; d) frotiu din cultura în mediu lichid; e) o ansă de ser fiziologic depusă pe lamă pentru suspensionarea culturii de pe mediu solid.

In cursul etalării ansa și acul se manipulează cu mișcări lente. Aceasta evită formarea aerosolilor (pericol de contaminare) și perturbarea dispoziției caracteristice a bacteriilor în produs (fig.16).

In cazul fragmentelor de țesuturi (bioptice sau necroptice) se efectuează amprente: pe suprafața de secțiune a țesutului se aplică lama în așa fel încît în porțiunea ei centrală să rămînă amprenta țesutului. Alternativ, frotiul poate fi executat prin ștergerea lamei cu suprafața de secțiune a țesutului.

- U s c a r e a : se face la temperatura camerei.

- F i x a r e a prin căldură: lama, cu frotiul uscat în sus, este trecută de cîteva ori prin flacăra unui bec de gaz. Temperatura de fixare nu trebuie să fie prea ridicată pentru a nu distorsiona elementele structurale ale bacteriei. Timpul de menținere în flacără nu trebuie să depășească 5-10 sec., lama nu trebuie să frigă atunci cînd atingem cu ea dosul mîinii.

(ii) Metode de colorare*)

- Colorațiile simple evidențiază numai morfologia microbilor (dimensiune, formă, gruparea celu-

*) Pentru prepararea coloranților și reactivilor necesari vezi anexa A.

lelor, prezența sporilor, a capsulei) (fig.17) - de exemplu, colorația cu albastru de metilen.

FORMELE DE BAZA SI DISPOZITIA CELULELOR BACTERIENE

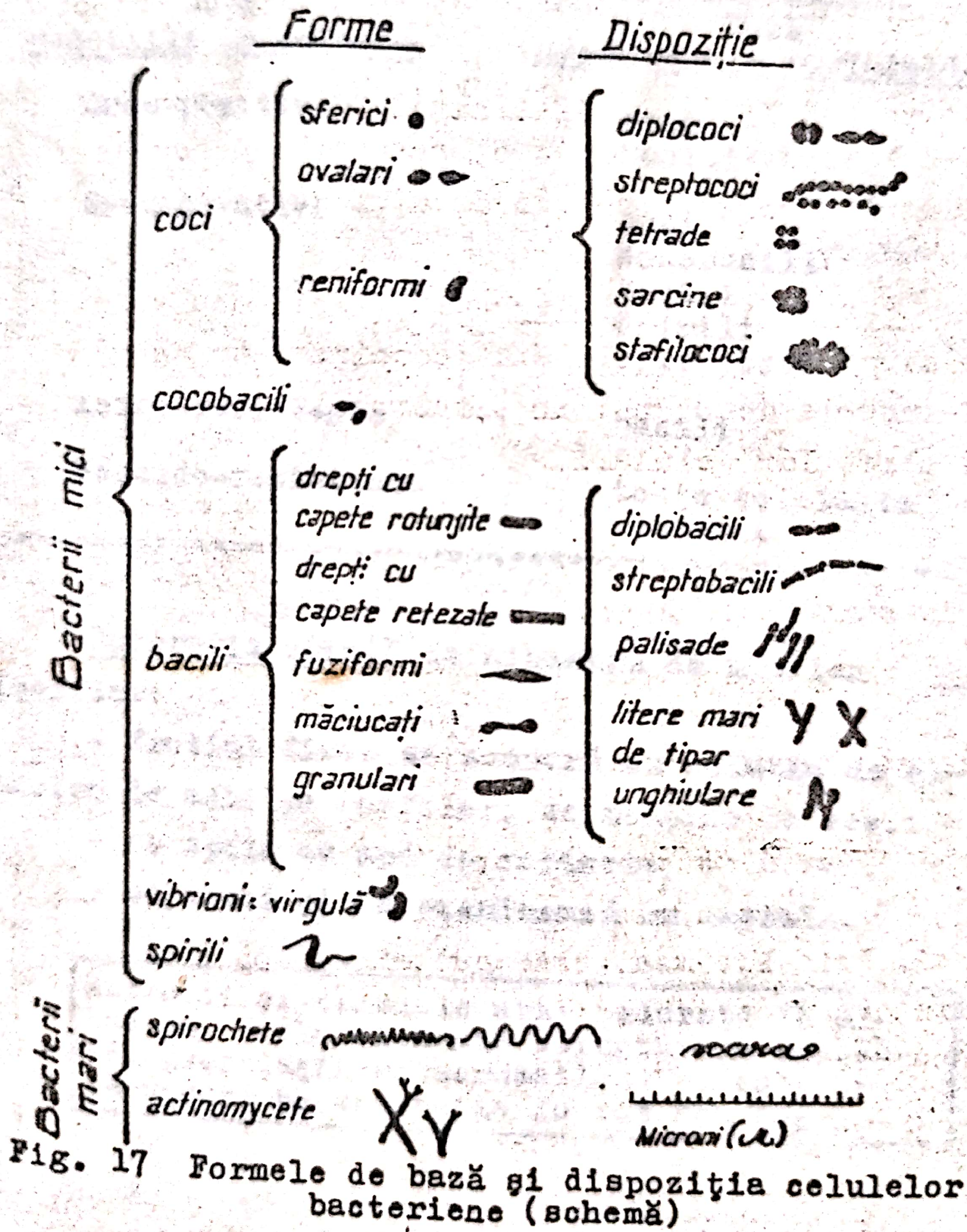


Fig. 17 Formele de bază şi dispoziția celulelor bacteriene (schemă)

- Coloraţiile speciale se folosesc pentru a evidenţia unele detalii morfologice ale celulei bacteriene (granulaţii metacromatice, flageli etc.) pe care metodele obişnuite de colorare nu le pot evidenţia întotdeauna.

- Coloraţiile diferenţiale evidenţiază afară de caractere morfologice şi reacţiile de culoare ale microbilor: coloraţia Gram şi coloraţia Ziehl-Neelsen.

Reacţiile de culoare (sau afinitatea tinctorială) ale bacteriilor sînt condiţionate de diferenţele de structură şi compoziţie chimică ale pereţilor celulari.

Pe baza afinităţii tinctoriale bacteriile se împart în gram-pozitive şi gram-negative sau în acido-rezistente şi neacido-rezistente.

Aşadar examenul microscopic al preparatelor colorate permite clasificarea bacteriilor într-un grup major sau altul în funcţie de

(a) afinitatea tinctorială şi

(b) caracterele morfologice pe care le prezintă. Prin aceasta, examenul microscopic este prima etapă de identificare a unei bacterii necunoscute (tabelul 2).

Tabelul 2
Clasificarea bacteriilor după reacţiile de culoare şi caracterele morfologice

După reacţiile de culoare	După caracterele morfologice
Gram-pozitive	coci bacili
Gram-negative	coci cocobacili bacili spirili spirochete
Acido-rezistente	bacili
Neacido-rezistente	toate celelalte bacterii

Coloraţia simplă cu albastru de metilen Loeffler:

- frotiul fixat se acoperă cu soluţia de albastru de metilen Loeffler; se menţine 3o sec.;
- se spală cu apă de robinet;
- se usucă şi se examinează cu imersia.

Microbii şi celulele apar coloraţi în albastru. Unele elemente structurale (capsulă, granulaţii metacromatice) se colorează uneori metacromatic în roz sau roşu.

Coloraţii diferenţiale

Coloraţia Gram

Soluţiile colorante şi reactivii necesari:

- violet de metil sol.apoasă o,2% ,
- soluţie Lugol,
- amestec alcool-acetonă,
- fucsină Ziehl diluată 1/lo

Tehnica coloraţiei Gram:

- Colorarea: frotiul se acoperă cu soluţia de violet de metil; se menţine 3o-6o sec. după care se spală cu apă de robinet.

- Mordanţarea: frotiul se acoperă cu soluţia Lugol; după cîteva sec. se varsă şi se acoperă din nou cu aceeaşi soluţie; se menţine 4-5 minute; se varsă şi fără a se spăla se trece la timpul următor

- Diferenţierea (decolorarea): se acoperă frotiul cu amestecul alcool-acetonă; decolorarea se continuă pînă cînd în amestecul decolorant nu mai trec urme vizibile de colorant (cca 5-lo sec. pentru frotiurile din culturi microbiene, lo-15 sec., în raport cu grosimea frotiului, în cazul celor din produse patologice); în acest moment se spală cu apă de robinet.

- Recolorarea: frotiul se acoperă cu soluţia de fucsină Ziehl 1/lo; se menţine 3o-6o sec. după care se spală cu apă de robinet; se usucă şi se examinează la microscop cu imersia.

Bacteriile gram-pozitive apar colorate în violet iar cele gram-negative în roşu. Celulele tisulare apar cu citoplasma colorată în roz iar nucleul în roşu.

Verificarea reactivilor pentru coloraţia Gram. Pentru fiecare lot de frotiuri, se colorează în aceleaşi condiţii şi se examinează un frotiu martor. Frotiul martor se efectuează dintr-o suspensie de Escherichia coli şi stafilococ auriu cultivaţi peste noapte la 37°C şi sterilizaţi imediat prin autoclavare. Pe frotiul martor diferenţa dintre bacilii gram-negativi şi cocii gram-pozitivi trebuie să fie netă.

Coloraţia Ziehl-Neelsen

Mycobacteriile, spre deosebire de toate celelalte bacterii, datorită prezenţei în peretele bacterian a unor substanţe ceroase, se colorează la cald cu fucsină bazică şi rezistă la decolorarea cu acizi minerali diluaţi şi cu alcool.

Soluţiile colorante şi reactivii necesari:
- fucsină fenicată Ziehl,
- acid azotic diluat 1/3,
- alcool etilic 96°,
- albastru de metilen Loeffler

Tehnica coloraţiei Ziehl-Neelsen:

- Colorarea: frotiul fixat şi aşezat pe stativul de colorare se acoperă cu soluţia de fucsină Ziehl şi se încălzeşte cu ajutorul unei lămpi de spirt pînă la emitere de vapori (fără a se ajunge

la fierbere); se menţine 10 min.la această temperatură reîncălzind din cînd în cînd. Frotiul trebuie să fie în permanenţă acoperit cu colorant. De aceea, la nevoie se poate adăuga o nouă cantitate de colorant. Se spală lama abundent cu apă de robinet.

- Decolorarea: se acoperă frotiul cu soluţia de acid azotic 1/3. Amestecul decolorant ia culoarea galbenă iar culoarea roşie a frotiului dispare. Durata decolorării variază în raport cu grosimea frotiului. După cca un minut se spală cu apă de robinet. Dacă frotiul devine alburiu, decolorarea este terminată. Dacă redevine roşu, se continuă decolorarea.

Se decolorează cu alcool timp de cîteva secunde. Se spală cu apă de robinet.

- Recolorarea: frotiul se acoperă cu sol. albastru de metilen Loeffler pentru 1 minut. Se spală cu apă de robinet. Se usucă şi se examinează la microscop cu imersia.

Bacilii acido-rezistenţi apar coloraţi în roşu. Bacteriile neacido-rezistente apar colorate în albastru ca şi celulele tisulare a căror citoplasmă se colorează în albastru deschis iar nucleul în albastru închis.

Verificarea reactivilor pentru coloraţia Ziehl-Neelsen se face prin colorarea şi examinarea unui frotiu dintr-o suspensie de micobacterii omorîte.

(iii) <u>Examenul microscopic cu imersia</u>

Principiile de funcţionare şi părţile componente ale microscopului sînt deja cunoscute de studenţi în sem.IV. De aceea, ne rezumăm la prezentarea <u>tehnicii de examinare şi întreţinere a microscopului cu imersie</u>.

- Se depune o picătură de ulei de cedru pe frotiul colorat.

- Se pune lama pe platina microscopului şi se fixează cu ajutorul cavalerilor astfel încît picătura de ulei de cedru să fie în dreptul axului optic al microscopului.

- Se aduce în axul optic al microscopului obiectivul cu imersie prin rotirea revolverului.

- Se ridică condensatorul la maximum iar diafragmul de cîmp se deschide la maximum.

- Privind lateral, se coboară tubul microscopului, manipulînd cu viza macrometrică, pentru a face contactul între lentila frontală a obiectivului şi picătura de ulei de cedru de pe lamă. Se impune atenţie pentru a nu sparge lama sau lentila obiectivului.

- Privind prin ocular se centrează lumina cu ajutorul oglinzii concave.

- Se prinde imaginea manipulînd cu atenţie viza macrometrică.

- Se pune la punct imaginea manipulînd viza micrometrică. Viza micrometrică nu se manipulează mai

mult de 1-2 rotaţii înainte sau înapoi.

La terminarea examenului:

- Se ridică tubul microscopului cu 1-2 cm.

- Se dă jos preparatul de pe platina microscopului.

- Se şterge bine cu pulpa degetului lentila obiectivului. Se şterge degetul cu un tifon.

- Se pune microscopul la adăpost de praf (sub husă sau în cutie).

(2) <u>Preparate microscopice necolorate (umede)</u>

Examenul microscopic al preparatelor necolorate ale bacteriilor vii suspensionate în ser fiziologic este folosit pentru obsevarea mobilităţii acestora, rareori şi a formei şi dimensiunilor aproximative.

Citoplasma bacteriilor este incoloră şi are un indice de refracţie puţin diferit de al mediului de suspensie - în general apos (mediu de cultură, produs patologic, ser fiziologic). Din această cauză, bacteriile necolorate devin vizibile la microscop numai în condiţii speciale de iluminare: (i) reducerea diafragmului de cîmp, (ii) examen pe fond negru, (iii) microscopie în contrast de fază. Aceste metode nu sînt utilizate ca metode de rutină.

In preparatele umede mobilitatea bacteriilor trebuie deosebită de mişcarea browniană (vibraţii

neregulate, rapide, de mică amplitudine cauzate de bombardamentul molecular) şi de mişcările produse de curenţii de lichid (în care bacteriile sînt antrenate toate în aceeaşi direcţie). Criteriul de apreciere a mobilităţii reale a bacteriilor este modificarea poziţiei relative a două bacterii una faţă de alta.

Bacteriile cu refringenţă redusă - spirochetele, leptospirele - nu pot fi examinate în stare vie decît la microscopul cu fond negru.

(i) Examinarea unui preparat umed la microscopul obişnuit

- pe o lamă de microscop curată se depune cu pipeta Pasteur o picătură din suspensia bacteriană de cercetat (cultură sau produs patologic);

- picătura se acoperă cu o lamelă curată ale cărei margini au fost unse în prealabil cu ulei de parafină pentru a evita evaporarea lichidului în cursul examenului (permite în acelaşi timp examinarea mobilităţii bacteriilor anaerobe);

- se coboară condensatorul şi se închide parţial diafragma de cîmp;

- se aşează preparatul pe platina orizontală şi se examinează cu un obiectiv uscat puternic (x40) după 2-3 min. necesare pentru stabilizarea preparatului;

- după examinare, preparatul se depune într-un

borcan cu soluţie dezinfectantă (amestec sulfo-cromic).

(ii) Efectuarea examenului microscopic pe fond negru

Material necesar:

- condensator cardioid sau paraboloid;
- sursă puternică de lumină prevăzută cu un condensator pentru a furniza un fascicol de raze paralele;
- obiectiv cu apertură numerică sub 1. Dacă se utilizează obiective cu imersie este necesar sa acestea să fie prevăzute cu un diafragm iris sau alt dispozitiv de reducere a aperturii pentru a împiedeca pătrunderea razelor directe.

Examinarea:

- se depune pe suprafaţa lentilei condensatorului o picătură de ulei de cedru şi se coboară uşor condensatorul;

- se pune preparatul între lamă şi lamelă (pregătit ca mai sus) pe platina orizontală a microscopului, după ce în prealabil s-a depus o picătură de ulei de cedru pe faţa inferioară a lamei. Lamele utilizate pentru microscopia pe fond negru trebuie să aibă o grosime de 1,0 - 1,1 mm pentru a situa preparatul în focarul condensatorului (distanţa focală de 1,2 mm).

- Se ridică uşor condensatorul pentru a face contactul celor 2 picături de ulei de cedru;

- se centrează lumina privind printr-un obiectiv slab (x10). Fascicolul luminos de la sursă este

orientat spre condensator cu fața plană a oglinzii. Dacă centrarea oglinzii este bună în centrul cîmpului trebuie să se observe un inel luminos strălucitor (imaginea sursei de lumină).

- Fără a schimba obiectivul, se centrează condensatorul ridicîndu-l sau coborîndu-l ușor pînă cînd imaginea sursei de lumină se reduce la un punct strălucitor cît mai mic posibil. In acest moment preparatul se află în focarul condensatorului. Cînd preparatul se află deasupra sau dedesubtul focarului condensatorului imaginea sursei luminoase este inelară.

- Se schimbă obiectivul cu care s-a făcut centrarea luminii și a condensatorului cu obiectivul ales pentru examinarea preparatului. Se prinde și se pune la punct imaginea.

- După examinare, preparatul se depune în borcanul cu soluție dezinfectantă.

3 CULTIVAREA BACTERIILOR. IZOLAREA IN CULTURI PURE

Bacterii aparţinînd unor specii diferite pot avea caractere morfologice şi reacţii de culoare asemănătoare. De aceea, identificarea bacteriilor impune studierea unui complex de caractere suplimentare. Acestea sînt cercetate pe culturi obţinute prin creşterea bacteriilor *in vitro* pe *medii de cultură*.

Dacă în proba studiată coexistă mai multe specii microbiene, în scopul identificării lor, este necesară izolarea prealabilă a fiecărei bacterii în cultură pură.

Uneori, în produse patologice microbii sînt în număr redus şi nu pot fi văzuţi la examenul direct microscopic, dar pot fi evidenţiaţi (izolaţi) prin cultivare pe medii adecvate.

Se impun cunoscute 2 operaţii distincte:

(A) prepararea unor medii de cultură adecvate,

(B) izolarea în cultură pură a microbilor.

(A) MEDIILE DE CULTURA

(1) Calităţile de bază ale unui mediu de cultură

Mediile de cultură trebuie să permită multiplicarea bacteriilor ca şi manifestarea tuturor proprietăţilor lor biologice care le caracterizează ca unităţi taxonomice (specii, genuri etc.). Pentru aceasta trebuie să posede următoarele calităţi:

(a) să fie nutritiv,

(b) să îndeplinească condiţiile fizico-chimice de osmolaritate, pH, potenţial de oxido-reducere optime pentru dezvoltarea bacteriilor,

(c) să permită urmărirea facilă a apariţiei culturilor microbiene şi a tuturor modificărilor legate de aceasta.

Mediile lichide trebuie să fie perfect clare; numai în acest mod poate fi surprinsă opacifierea determinată de cultivarea bacteriilor. Mediile solide trebuie să aibă suprafaţa perfect plană şi lucioasă pentru a permite observarea apariţiei coloniilor bacteriene care uneori au dimensiuni foarte reduse.

(d) să fie sterile.

(2) Clasificarea mediilor de cultură

(a) După consistenţă

(i) Medii lichide (bulion nutritiv, apă peptonată ş.a.).

In mediu lichid bacteriile aparţinînd diferitor specii cultivă amestecate unele cu altele. Pentru aceste motive

> mediile lichide sînt folosite îndeosebi pentru studiul caracterelor biochimice ale bacteriilor izolate în cultură pură, izolarea bacterilor din unele produse patologice monobacteriene etc.

Pentru utilizare, mediile de cultură lichide se repartizează în eprubete, baloane etc. (fig.18).

(ii) Medii solide

Cel mai frecvent sînt obţinute prin gelificarea mediilor lichide cu agar (fitocoloid polizaharidic extras din diferite specii de alge marine) (geloză-nutritivă, geloză-sînge etc.). Medii solide mai pot fi obţinute prin coagularea termică a unor lichide biologice cu înalt conţinut proteic (ser sanguin, ou).

Pe suprafaţa mediilor solide sau în profunzimea lor bacteriile cultivă sub formă de colonii.

Colonia este o acumulare locală de bacterii descendente dintr-un singur individ.

Această populaţie bacteriană descendentă în linie verticală dintr-un singur individ şi care alcătuieşte o colonie bacteriană, are caractere genetice comune şi poartă numele de clonă sau tulpină bacteriană.

De multe ori aspectul coloniilor este deosebit de la un microb la altul.

Mediile solide sînt folosite pentru izolarea bacteriilor în culturi pure şi pentru studierea caracterelor de cultură ale acestora. Mai sînt folosite şi pentru studiul unor caractere biochimice.

Pentru utilizare, mediile solide se repartizează în plăci Petri, în eprubete, unde sînt solidificate în coloană sau în pantă (fig.18).

(iii) Medii semisolide (geloza moale). Sînt obţinute prin gelificarea bulionului nutritiv printr-o cantitate mai redusă de agar (5‰ în mediile semisolide faţă de 20‰ în cele solide). Sînt folosite pentru studiul mobilităţii bacteriilor şi a unor caractere biochimice. Pentru utilizare, mediile semisolide se repartizează în coloană în tuburi.

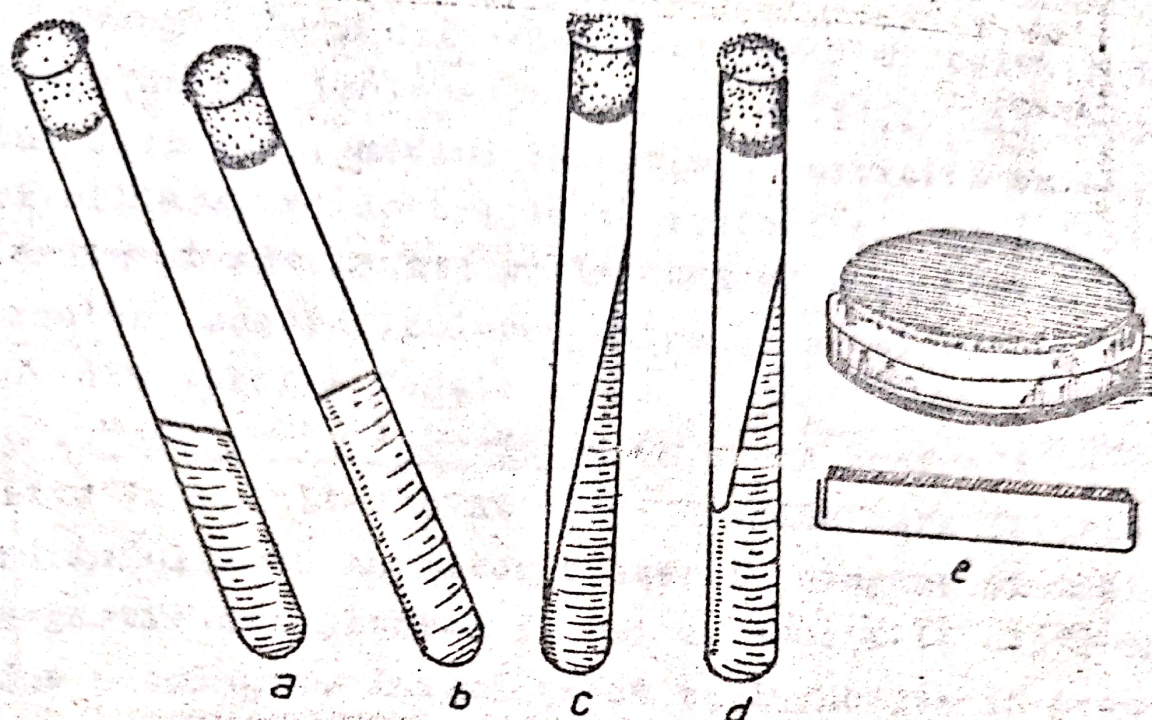


Fig.18 Diferite modalităţi de repartizare a mediilor de cultură: (a) mediu lichid în tub; (b) geloză nutritivă repartizată în coloană; (c) idem în pantă; (d) idem în coloană şi pantă; (e) idem în placă Petri

(b) După compoziţie

(i) Medii simple sau medii de bază (bulionul nutritiv, geloza nutritivă etc.).

Mediile simple permit cultivarea unui număr apreciabil de bacterii. Conţin numai ingredientele de bază: extractul de carne, peptonă, clorură de sodiu.

(ii) Medii compuse (îmbogăţite) (bulion glucozat, bulion ser, geloză sînge etc.). Sînt destinate cultivării unor bacterii pretenţioase nutritiv. Se

obţin prin adăugarea de sînge, lichid de ascită, ser, extract de levură (aport de factori de creştere) sau zaharuri (glucoză) la mediile de bază.

(iii) Medii speciale

- Medii de izolare. Izolarea microbilor se poate face pe orice mediu solid corespunzător din punct de vedere nutritiv. Pentru a facilita însă izolarea microbilor patogeni din produse patologice cu floră de contaminare (materii fecale, exsudat faringian etc.) se utilizează o serie de medii speciale:

• Mediile de diferenţiere sînt medii care conţin substratul pentru o enzimă bacteriană caracteristică şi un indicator care evidenţiază atacarea acestui substrat. Aceste medii evidenţiază un caracter metabolic care diferenţiază între ei microbi cu caractere de cultură şi morfologice identice. De exemplu, mediul Drigalski (geloză nutritivă lactozată şi turnesolată) permite diferenţierea enterobacteriilor lactozo-pozitive de cele lactozo-negative. Geloza sînge permite diferenţierea bacteriilor după absenţa sau prezenţa şi tipul hemolizei produse.

• Mediile selective sînt medii solide care conţin substanţe cu acţiune inhibitorie pentru dezvoltarea altor bacterii decît acelea a căror izolare se urmăreşte. Pentru a facilita reperarea coloniilor unei anumite bacterii, mediile selective conţin ingrediente care le imprimă şi caracterul de

mediu diferenţial.

Exemple de medii selective: medii cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric din exsudatul faringian; mediul SS (geloză nutritivă cu săruri biliare, verde brillant, citraţi şi hiposulfit de sodiu şi adiţionată cu lactoză şi roşu neutru ca indicator) pentru izolarea shigellelor şi salmonellelor din materii fecale.

- Mediile de îmbogăţire (a nu se confunda cu mediile îmbogăţite) sînt medii lichide care favorizează înmulţirea anumitor bacterii patogene şi inhibă selectiv dezvoltarea florei de asociaţie dintr-un produs patologic. Insămînţarea şi incubarea în aceste medii este utilă ca etapă premergătoare însămînţării pe medii selective atunci cînd se urmăreşte izolarea unei bacterii patogene care se află în număr redus în produse cu floră de asociaţie abundentă.

Exemple de medii de îmbogăţire: mediul Kauffmann-Müller (bulion nutritiv tetrationat) sau mediul cu selenit acid de sodiu inhibă flora coliformă în favoarea salmonellelor în probe de materii fecale.

- Medii de identificare. La un mediu nutritiv de bază se incorporează un ingredient care constituie substratul activităţii unei enzime bacteriene şi un indicator adecvat care evidenţiază modificarea substratului în cursul activităţii bacteriei cercetate. Baterii cu asemenea medii sînt folosite pentru identificarea bacteriilor.

mediu diferenţial.

Exemple de medii selective: medii cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric din exsudatul faringian; mediul SS (geloză nutritivă cu săruri biliare, verde brillant, citraţi şi hiposulfit de sodiu şi adiţionată cu lactoză şi roşu neutru ca indicator) pentru izolarea shigellelor şi salmonellelor din materii fecale.

- Mediile de îmbogăţire (a nu se confunda cu mediile îmbogăţite) sînt medii lichide care favorizează înmulţirea anumitor bacterii patogene şi inhibă selectiv dezvoltarea florei de asociaţie dintr-un produs patologic. Insămînţarea şi incubarea în aceste medii este utilă ca etapă premergătoare însămînţării pe medii selective atunci cînd se urmăreşte izolarea unei bacterii patogene care se află în număr redus în produse cu floră de asociaţie abundentă.

Exemple de medii de îmbogăţire: mediul Kauffmann-Müller (bulion nutritiv tetrationat) sau mediul cu selenit acid de sodiu inhibă flora coliformă în favoarea salmonellelor în probe de materii fecale.

- Medii de identificare. La un mediu nutritiv de bază se incorporează un ingredient care constituie substratul activităţii unei enzime bacteriene şi un indicator adecvat care evidenţiază modificarea substratului în cursul activităţii bacteriei cercetate. Baterii cu asemenea medii sînt folosite pentru identificarea bacteriilor.

(B) CULTIVAREA SI OBTINEREA BACTERIILOR IN CULTURA PURA

(1) Insămînțarea și izolarea bacteriilor în cultură pură

Insămînțarea constă în depunerea într-un mediu de cultură a materialului bacterian (produs patologic sau cultură), inoculum, în vederea cultivării bacteriilor.

Repicarea este însămînțarea într-un mediu de cultură proaspăt a unei bacterii dintr-o altă cultură.

Izolarea este operația prin care o bacterie este obținută în cultură pură.

In funcție de natura inoculum-ului și a mediului de cultură, pentru însămînțare și izolare se folosesc instrumente variate.

Acul de însămînțare este confecționat din sîrmă ino-[illegible] (platină sau crom-nichel) a cărei grosime depinde de consistența materialului microbian manipulat. Una din extremitățile firului este fixată într-o baghetă de sticlă sau de metal. Cealaltă extremitate poate fi dreaptă, în care caz se numește ac simplu și se utilizează pentru repicările coloniilor de dimensiuni mici, pentru însămînțările prin înțepare etc. Cînd firul se termină printr-o buclă (cu diametru variabil de la 1 la cîțiva mm) este numit ansă sau oeză și se utilizează pentru însămîn-



Fig.19 Acul de însămînţare: a) ac simplu, b) ansă, c) spatulă

ţarea pe medii lichide sau solide. Din fire groase, turtite la capăt se obţine spatula utilizată pentru manipularea coloniilor bacteriene cu o consistenţă deosebită (fig.19).

Pipeta Pasteur este o pipetă capilară obţinută prin efilarea unui tub de sticlă.

(i) Insămînţarea cu epuizarea inoculum-ului pe suprafaţa mediului în plăci Petri este metoda de elecţie pentru izolarea bacteriilor din produse plurimicrobiene. Placa - cu suprafaţa mediului bine uscată prin menţinerea cca 3o min. la termostat la 37°C cu capacul întredeschis (fig.2o A) - se ţine pe masa de lucru. Cu mîna stîngă se întredeschide capacul. Ansa se ţine în mîna dreaptă, ca un creion, oblic faţă de suprafaţa mediului (fig.2oB). Se apasă foarte uşor pentru a evita zgîrierea acestuia.

O mică poţiune din produsul bacterian este

dispersată cu ajutorul ansei sau cu tamponul (dacă recoltarea probei de la pacient s-a făcut în acest fel) pe un sector limitat al plăcii (fig.21 A). Se sterilizează ansa; se verifică temperatura prin atingerea mediului. Trecînd cu ansa peste suprafaţa însămînţată, se descriu 3-4 striuri paralele la distanţa de 5-10 mm unul de altul pe un alt sector al plăcii (fig.21 B). Se repetă operaţia peste sectoarele C, D şi E ale plăcii. In acest mod, în ultimile arii însămînţate se vor obţine colonii bine individualizate.

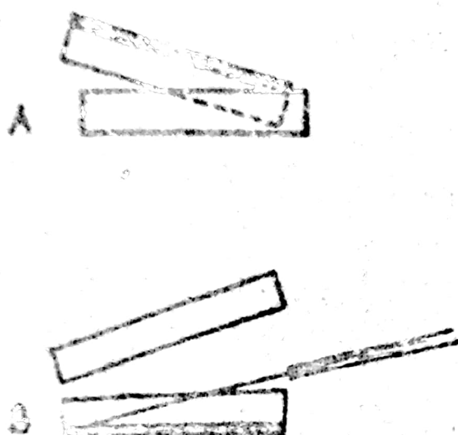


Fig.21 A-uscarea suprafeţei mediului la termostat; B-poziţia ansei faţă de suprafaţa mediului în timpul însămînţării pe o placă Petri

(2.) Insămînţarea pe suprafaţa mediilor solidificate în pantă (geloză înclinată), respectînd condiţiile de asepsie, se introduce ansa cu inoculum în tubul cu mediu pînă deasupra lichidului de condensare. Se retrage ansa descriind pe suprafaţa mediului, cu grijă pentru a nu-l zgîria, striuri în zigzag pentru dispersia inoculum-ului. In acest mod se epuizează ansa pe mai multe tuburi. Pe suprafaţa mediului din ultimile tuburi se vor obţine colonii

izolate.

(iii) <u>Insămînţarea prin înţepare în mediu semisolid repartizat în coloană</u> se utilizează pentru cercetarea mobilităţii, a unor caractere biochimice, sau pentru conservarea bacteriilor în laborator. Se efectuează cu acul simplu.(fig.22).

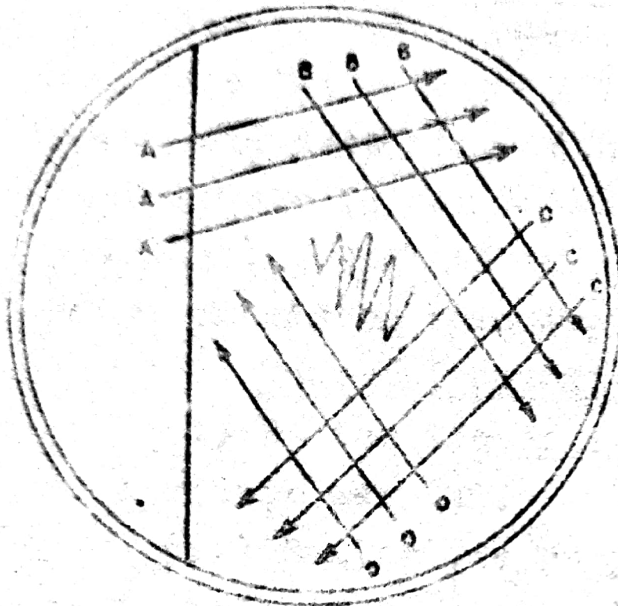


Fig.21 Schema de dispersie a inoculum-ului pe suprafaţa mediului repartizat în placă Petri

(iv) <u>Metode speciale de izolare</u> se folosesc în următoarele cazuri:

- izolarea pe medii lichide se face exclusiv din produse monobacteriene în care bacteriile se află în număr mic, prea mic pentru a putea fi evidenţiate microscopic sau izolate pe medii solide. Pentru izo-

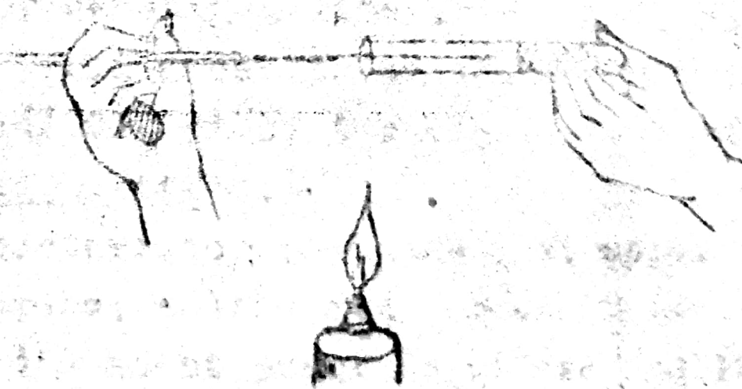


Fig.22 Insămînţarea prin înţepare în coloană de geloză moale

lare se procedează la însămînţarea unei cantităţi mari din produs (cîteva picături pînă la cîţiva ml)

- Izolarea bacteriilor sporulate de cele nesporulate pe baza termorezistenţei sporilor. Produsul în care sînt prezente bacterii sporulate este suspensionat în ser fiziologic şi încălzit la baia de apă la 80°C timp de 10 min. după care se face însămînţarea pentru izolare în condiţiile amintite mai sus.

- Izolarea prin însămînţări pe suprafaţa mediilor selective.

- Izolarea prin metode biologice se bazează pe sensibilitatea particulară, selectivă a unor animale de laborator faţă de unele specii bacteriene (sensibilitatea particulară a şoarecelui pentru pneumococ sau a cobaiului pentru bacilul tuberculozei etc.).

(2) Incubarea

Incubarea constă în menţinerea mediilor de cultură, însămînţate, în condiţii necesare dezvoltării culturii: condiţii de temperatură, raportul faţă de oxigen ş.a. Pentru majoritatea speciilor bacteriene culturile apar după cca 18-24 ore de incubare la temperatura optimă de dezvoltare. Pentru unele specii perioada de incubare necesară apariţiei culturii este mai lungă: de la cîteva zile pînă la cîte-

va săptămîni.

(a) Condițiile de temperatură

Bacteriile patogene sînt organisme mezofile, majoritatea avînd temperatura optimă de dezvoltare cuprinsă între 3o și 37°C. Această temperatură constantă este asigurată prin menținerea mediilor însămînțate în termostat - dulap sau încăpere termoizolată prevăzută cu sursă de încălzire (electrică) și un sistem termoreglator.

(b) Raportul cu oxigenul

(i) Bacteriile strict aerobe sînt cultivate în prezența aerului.

(ii) Bacteriile strict anaerobe sînt cultivate la adăpost de oxigenul liber.

(iii) Bacteriile facultativ anaerobe pot fi cultivate atît în prezența cît și în absența O_2.

(iv) Bacteriile microaerofile cultivă numai în prezența urmelor de oxigen liber.

(v) Unele bacterii necesită pentru dezvoltare o atmosferă cu 5-1o% CO_2 și sînt cunoscute sub numele de bacterii carboxifile.

Majoritatea bacteriilor patogene sînt aerobe și facultativ anaerobe; cultivarea lor nu impune condiții speciale din acest punct de vedere: cultivă pe medii aerobe.

Cultivarea în anaerobioză . Indepărtarea oxigenului liber și prezervarea culturii de contactul cu oxigenul atmosferic se obțin prin:

- „regenerarea" mediilor*) repartizate în recipiente care asigură un contact redus cu aerul**) şi prezervarea lor, după inoculare, de contactul cu aerul printr-un strat de ulei de parafină;

- adăugarea la medii a unor ingrediente cu activitate reducătoare (acid thioglicolic, carne prăjită ş.a.);

- incubarea culturii în recipiente speciale (anaerostate) din care aerul poate fi îndepărtat şi înlocuit cu hidrogen.

- In lipsa anaerostatului, într-o cutie Petri poate fi creată o incintă etanşă din care O_2 este îndepărtat prin reacţia cu pirogallolul în mediu alcalin***) (fig.23).

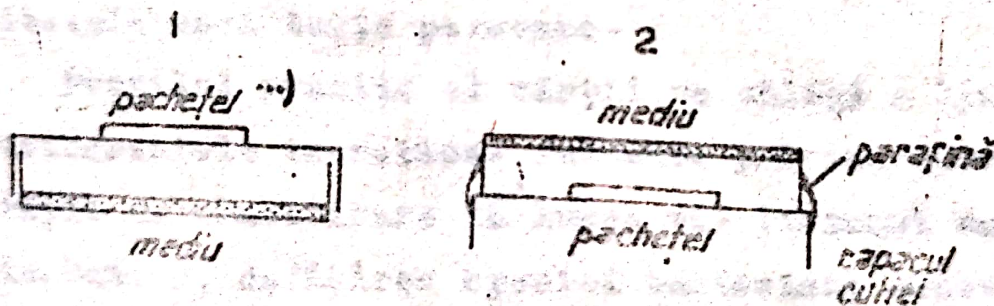


Fig.23 O modalitate simplă de formare a unei incinte anaerobe într-o cutie Petri

*) „Regenerare" = fierberea tuburilor cu mediu timp de 15 min. în baia de apă şi răcirea lor bruscă la curent de apă înaintea inoculării.

**) Tuburi Weinberg, tuburi cu mediu repartizat în coloană înaltă ş.a.

***) Un pachetel din hîrtie de filtru conţinînd pirogallol 0,4g/ CO_3K_2 0,4g/ talc 8g este prins cu bandă adezivă de capacul cutiei cf.schemei din fig.23.

Cultivarea în atmosferă cu bioxid de carbon. Culturile sînt introduse în termostat într-un borcan închis. Dacă într-un asemenea borcan este lăsată să ardă o lumînare, cînd concentrația bioxidului de carbon atinge 5-10%, lumînarea se stinge.

./.

PARTEA A DOUA

B. IDENTIFICAREA BACTERIILOR. TEHNICI GENERALE

Vorbind despre lucrurile şi fiinţele care ne înconjoară le dăm un nume, nu le descriem prin ansamblul caracterelor lor. Pentru aceasta omul a fost obligat să compare lucrurile şi fiinţele, să le reunească în aceeaşi grupă pe cele mai asemănătoare pentru a le putea desemna sub acelaşi nume (definirea şi marcarea unităţilor); a fost obligat să clasifice (aranjarea unităţilor într-un sistem).

Numai un sistem de unităţi raţional marcate permite a identifica, prin comparaţie, altele, şi a comunica rezultatele unei terţe persoane.

Profilul practic al cărţii ne obligă a limita aici considerentele teoretice. Amănunte privind specificul unităţii de clasificare în lumea vie (taxonul sau unitatea taxonomică), definirea speciei bacteriene etc.etc. sînt date în cursul teoretic şi pot fi aprofundate consultînd bibliografia aferentă capitolului.

Pentru a identifica o bacterie, se cercetează o sumă de caractere:

- caractere morfotinctoriale (vezi capitolul 2)
- caracterele de cultură (vezi capitolul 4),
- caracterele biochimice (vezi capitolul 4).

Prin comparaţie cu caracterele unităţilor taxonomice stabilite, bacteria studiată este încadrată progresiv într-o familie, gen, specie.

Cercetarea altor caractere:

- structura antigenică (vezi capitolul 6),

- spectrul de sensibilitate la bacteriofagi (lizotiparea), permite încadrarea bacteriei studiate într-o diviziune infraspecifică sau alta: serotip, lizotip ş.a.

De multe ori, în laboratorul de microbiologie clinică, sîntem interesaţi în urmărirea unor caractere specifice de tulpină:

- spectrul de sensibilitate la antibiotice (vezi capitolul 8),

patogenitate (vezi capitolul 5).

<u>Clinicianul</u> este interesat, în primul rînd, să ştie cu ce antibiotic poate ataca bacteria care s-a demonstrat a fi cauza unei infecţii (în eventualitatea în care aceasta impune un tratament antimicrobian) şi de-abia în al doilea rînd cum se numeşte această bacterie. De aceea, în laboratorul de bacteriologie clinică ordinea cercetării caracterelor unei bacterii în scopul identificării poate fi inversată şi să înceapă cu cercetarea caracterelor de tulpină (antibiograma).

<u>Epidemiologul</u> este interesat să ştie dacă între

tulpinile bacteriene izolate dintr-un focar epidemic de boală infecţioasă există sau nu i!entitate. De aceea laboratoarele de bacteriologie sanitară trebuie să-l informeze nu numai cum se numesc aceste bacterii ci şi asupra serotipului, biotipului,lizotipului ş.a. acestora.

4 CERCETAREA CARACTERELOR FIZIOLOGICE ALE BACTERIILOR

(A) CERCETAREA CARACTERELOR DE CULTURA

(1) Condiţiile optime de obţinere a culturii

Se reţin în acest cadru

- necesităţile nutritive (cultivare pe medii uzuale, simple sau numai pe medii îmbogăţite în anumiţi factori de creştere);
- cultivarea lentă sau rapidă;
- raporturile cu oxigenul (cultivare în aerobioză, anaerobioză etc.)

(2) Aspectul culturii

Aspectul culturii pe medii lichide prezintă prea puţine caractere distinctive pentru a putea fi utilizate cu folos în identificarea bacteriilor.

Aspectul coloniilor pe suprafaţa mediilor solide variază mai mult de la o specie bacteriană la alta fără a permite însă diferenţieri categorice.

Se urmăresc (fig.24):

- dimensiunea: colonii mari (2-3 mm diametru), colonii mici (o,1-1 mm diametru), colonii mijlocii (1-2 mm diametru);
- conturul: circular cu margini întregi, lobat,

fimbriat;

- relieful: plat, bombat, acuminat, papilat;
- suprafața: lucioasă, umedă sau uscată, rugoasă;
- culoarea: nepigmentate sau pigmentate;
- opacitatea: opace sau transparente;
- consistența: untoasă, mucoasă, friabilă, membranoasă;
- aderența la mediu: neaderente sau puternic aderente de suprafața mediului;
- emulsionabilitatea în ser fiziologic sau soluție de tripaflavină 1/5oo: emulsionabile sau neemulsionabile.

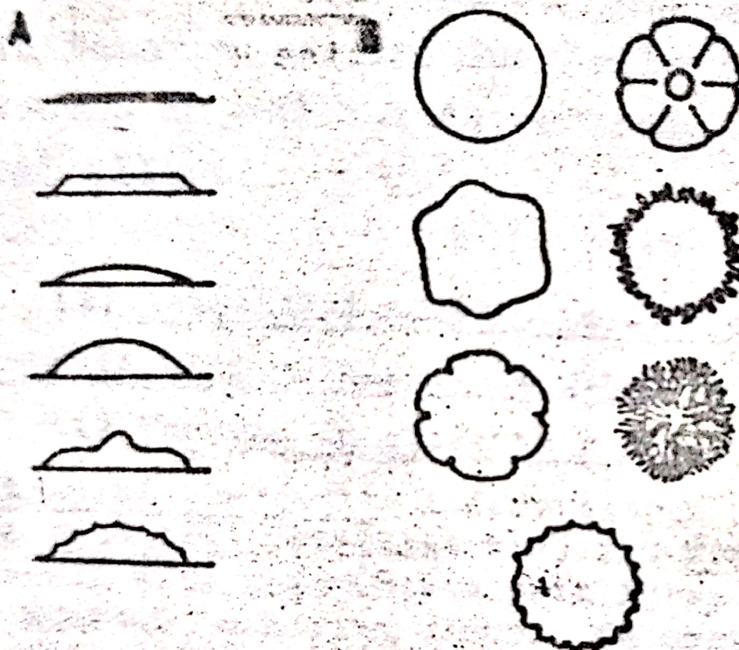


Fig.24 Relieful (A) și conturul (B) coloniilor bacteriene

Pe baza acestor caractere pot fi diferențiate variantele de cultură S și R.

Forma S (smooth=neted) colonii cu contur circular, regulat sau lobat, cu suprafața netedă, lucioasă și umedă, ușor emulsionabile în ser fiziologic ca și în soluția 1/5oo de tripaflavină.

Forma R (rough=rugos): colonii cu contur neregulat, crenelat sau fimbriat, cu suprafața rugoasă și uscată, care nu pot fi emulsionate în ser fiziologic sau soluția 1/5oo de tripaflavină.

Majoritatea bacteriilor, cît timp posedă patogenitatea și stuctura antigenică caracteristice, cultivă sub forma S. Trecerea acestor bacterii la forma R este legată de pierderea patogenității și de o degradare a structurii antigenice.

Numai un număr redus de bacterii se prezintă în mod normal în formă R: de exemplu, bacilul Koch.

Pe același mediu, colonii identice ca aspect pot aparține unor specii bacteriene diferite. Pe același mediu, colonii cu aspect diferit pot aparține aceleiași specii. Aceeași specie dezvoltă colonii cu aspect diferit în funcție de condițiile de cultivare.

(B) CERCETAREA ACTIVITATII BIOCHIMICE

Fiecare unitate taxonomică bacteriană (gen, specie etc.) are un spectru propriu de activitate enzimatică. Studierea acestuia are o importanță deosebită pentru identificarea bacteriilor. Activitatea enzimelor bacteriene este urmărită prin modificările pe care le produc asupra substratului corespunzător înglobat, de obicei, în mediu de cultură.

Se urmăresc:

- activități enzimatice în cadrul metabolismu-

lui energetic şi catabolismului glucidic;

- activităţi enzimatice în cadrul catabolismului protidic;

- determinarea unor necesităţi nutritive şi substanţe donatoare de energie.

Redăm un minim de date tehnice necesare parcurgerii lucrărilor practice privind identificarea bacteriilor. Studenţii nu au obligaţia de a reţine datele tehnice: pentru lucrările respective şi le vor consemna în caietul de referate şi vor lucra cu caietul alături.

(1) Activităţi enzimatice în cadrul metabolismului energetic şi catabolismului glucidic

(i) Punerea în evidenţă a căilor principale ale metabolismului energetic. Diferenţierea între metabolizarea pe cale oxidativă (respiratorie) sau fermentativă a glucozei: bacteria este însămînţată prin înţepare în 2 tuburi cu mediu adecvat conţinînd glucoză în proporţie de 1% şi un indicator de pH. Incubarea se face în condiţii de aerobioză şi anaerobioză. Dacă degradarea glucozei se face oxidativ, indicatorul virează numai în tubul incubat în aerobioză. Dacă se face fermentativ, virajul apare în ambele tuburi (fig. 25).

(ii) Evidenţierea sistemelor enzimatice respiratorii

Oxidaza. Pe o rondelă de hîrtie de filtru cu diametrul de cca 7 cm, introdusă într-o cutie Petri, se depun 2-3 picături din soluţia apoasă de tetrametil p.fenilendiamină sol.1% (soluţia este utilizabilă în intervalul de 2ore de la preparare). Pe locul unde a fost depus reactivul se dispersează imediat o ansă de cultură (ansă de pla-

tină). Apariţia unei culori roşii purpurii în interval de
lo sec. indică o reacţie pozitivă.

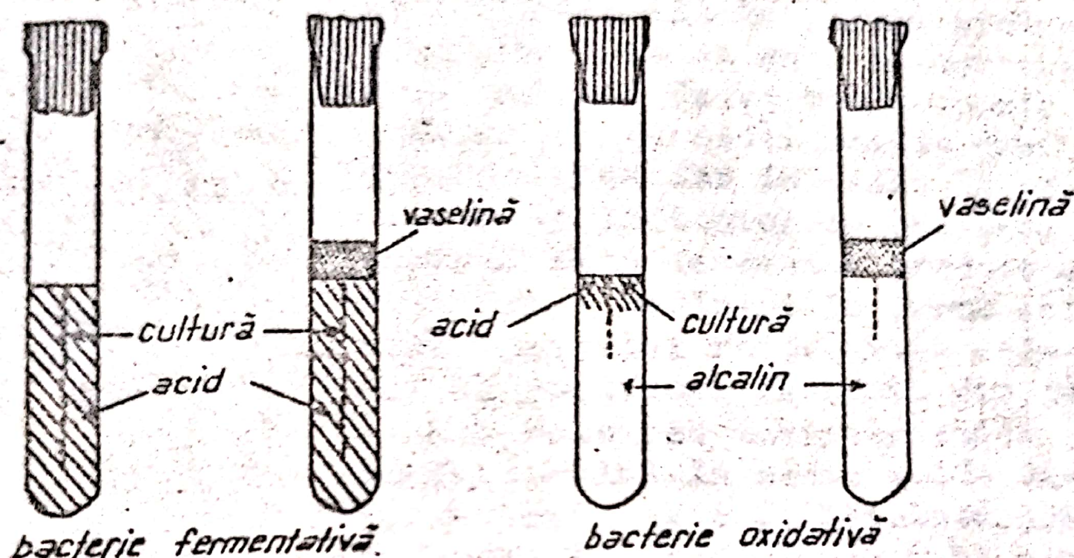


Fig.25 Proba de oxidare-fermentare

Bacteriile <u>oxidative</u>: produc o acidifiere redusă
(CO_2, care rezultă din oxidările cu care este cu-
plată respiraţia) limitată la zona aerobă a tubu-
lui neparafinat. In tubul parafinat nici o modi-
ficare sau chiar lipsa culturii. Bacteriile oxi-
dative sînt strict aerobe sau microaerofile.

Bacteriile <u>fermentative</u>: produc o acidificare in-
tensă (acumulare de acid lactic, acid formic etc.)
Acidificarea mediului se produce în ambele tuburi

Bacteriile fără acţiune asupra carbohidratului
lasă mediul nemodificat sau îl alcalinizează.

<u>Catalaza</u>. Intr-un tub de aglutinare se face o suspen-
sie densă a culturii de examinat în volum de 1-2 ml ser
fiziologic. Se adaugă cîteva picături de apă oxigenată
(sol.3% de peroxid de hidrogen). Nu se agită. Apariţia în

interval de 5 minute a unor bule de gaz indică o reacţie pozitivă. Nu se utilizează culturi provenite de pe medii cu sînge.

(iii) Determinarea căii fermentative prezintă interes pentru identificarea bacteriilor din familia E n t e r o b a c t e r i a c e a e. La aceste organisme există 2 căi fermentative principale; calea acidă mixtă şi calea butilen-glicolică.

Bacteriile care folosesc calea acidă mixtă acidifică puternic mediul (pH sub 4,5) prin acumulare de cataboliţi finali acizi (glucoză⟶acid piruvic⟶alcool etilic, acid acetic, acid formic, acid lactic, acid succinic). Acidifierea este pusă în evidenţă prin reacţia la roşu metil.

Bacteriile care folosesc calea butilen-glicolică produc o acidifiere redusă şi tranzitorie a mediului, cantitatea totală de acizi formaţi fiind mult mai mică decît în primul caz (glucoză⟶acid piruvic⟶acetilmetilcarbinol⟶butilen-glicol). Acetilmetilcarbinolul este pus în evidenţă prin reacţia Voges-Proskauer.

Bacteria cercetată este însămînţată în apă peptonată şi glucozată (mediul Clark-Lubs). După 24-48 ore de incubaţie la 37°C, se adaugă 2 picături din soluţia indicator de roşu metil. O reacţie pozitivă (bacteria cercetată fermentează glucoza pe calea acidă mixtă) se traduce prin apariţia unei culori roşii. Dacă reacţia este negativă, culoarea care apare este galbenă.

Dacă reacţia la roşu metil este negativă, se execută în continuare, pe acelaşi tub de cultură reacţia Voges-Proskauer. La un ml cultură se adaugă o,6 ml din soluţia alcoolică 5% de alfa-naftol şi o,2 ml soluţie apoasă 40% de KOH. Se agită. O reacţie pozitivă se traduce prin apariţia unei culori roşii intense între 15 min. şi o oră de la adăugarea reactivilor.

(iv) Spectrul de utilizare al hidraţilor de carbon se cercetează prin cultivarea bacteriei în apă peptonată în care s-a introdus hidratul de carbon respectiv şi un indicator de pH pentru evidenţierea metaboliţilor acizi.

Introducerea în mediu a unui <u>tub Durham</u> (tub mic închis la o extremitate şi introdus în mediu cu gura în jos) permite evidenţierea metaboliţilor gazoşi (fig.26). Tuburile sînt incubate timp de 7 zile la 37°C şi urmărite zilnic pentru producerea de acid şi gaz. Fermentarea unor hidraţi de carbon se poate cerceta şi pe medii solide după incorporarea lor în mediu împreună cu un indicator de pH. Dacă zahărul este fermentat produce acidifierea mediului în jurul coloniei bacteriei respective. Colonia şi porţiunea de mediu din jur capătă culoarea caracteristică indicatorului în mediu acid. Dacă bacteria este însămînţată prin înţepare în profunzimea unui astfel de mediu, producerea de gaz se evidenţiază prin fragmentarea coloanei de mediu de către bule de gaz.

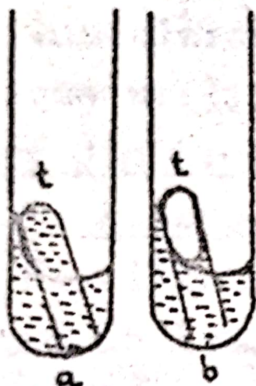


Fig.26 Tubul Durham (t) pentru evidenţierea producerii de gaz prin fermentarea zaharurilor: a-lipsa gazului; b-prezenţa gazului

(2) <u>Activităţi enzimatice în cadrul catabolismului protidic</u>.

(i) <u>Activitatea proteolitică</u> se cercetează prin însămînţarea bacteriei în mediu gelatinat (mediul însămînţat prin înţepare este incubat la 22°C şi se urmăreşte pînă la 30 zile pentru apariţia culturii şi a lizei), pe ser coagulat (urmărire pînă la 14 zile de incubaţie la 37°C).

(ii) <u>Producerea de H_2S</u>. Bacteria de cercetat se însămînţează prin înţepare în geloză nutritivă cu acetat de plumb sau în tubul în care cultivă bacteria cercetată se fixează pe dop o bandă de hîrtie de filtru impregnată cu acetat de plumb. Se urmăreşte apariţia sulfurii de plumb de culoare neagră: înnegrirea traiectului de însămînţare

a bacteriei sau înnegrirea hîrtiei de filtru indicator.

(iii) Producerea de urează se urmăre te prin însămînțarea bacteriei cercetate într-un mediu care conține uree și un indicator de pH. Virarea indicatorului în domeniu alcalin ca urmare a cultivării bacteriei atestă formarea de amoniac prin hidroliza ureei.

(iv) Producerea de indol prin dezaminarea triptofanului. Bacteria de cercetat este cultivată timp de 24-48 ore în apă peptonată. Apariția indolului se evidențiază cu ajutorul reactivului Ehrlich (p.dimetilaminobenzaldehidă 4 g, alcool etilic 96° 38o ml, acid clorhidric concentrat 8o ml). La tubul de cultură se adaugă 1 ml reactiv Ehrlich. Apariția unui inel roșu-rubiniu la suprafața mediului indică prezența indolului.

(v) Producerea de aminoacid-decarboxilaze se evidențiază prin apariția unei reacții alcaline în urma cultivării bacteriei cercetate în medii conținînd aminoacizii respectivi (arginină, lizină, ornitină).

(vi) Producerea aminoacid-dezaminazelor. Cultivarea bacteriei cercetate pe medii conținînd aminoacizii respectivi (fenilalanină etc.) determină apariția acizilor alfa-cetonici corespunzători. Aceștia dau cu clorura ferică o culoare verde.

(vii) Producerea arginin-hidrolazei. Bacteria cercetată se cultivă în mediu conținînd arginină. Ca urmare a hidrolizei argininei apare amoniac. O reacție pozitivă se traduce deci prin apariția de amoniac care dă cu reactivul Nessler o culoare brună.

(3) Determinarea unor necesități nutritive
Se face pe medii sintetice la care se adaugă substanțele respective: diferiți factori de creștere, substanțe oferite ca sursă de carbon, azot etc.

5 ANIMALELE DE LABORATOR IN INVESTIGATIA BACTERIOLOGICA

Inocularea experimentală la animale de laborator este utilizată pentru izolarea unor bacterii patogene din produse patologice sau/şi pentru identificarea acestora.

Speciile animale curent folosite•) în aceste scopuri în laboratorul de bacteriologie sînt rozătoarele mici: şoarecele şi cobaiul, mai rar iepurele.

Pentru obţinerea unor rezultate concludente în experimentarea pe animale în laboratorul de microbiologie este necesară

(i) alegerea speciei animale sensibilă selectiv pentru microbul suspectat;

(ii) proba legăturii între simptomele şi leziunile observate şi microbul inoculat. Trebuie eliminate:

- accidentul individual (se inoculează cel puţin 2 animale),
- accidente de cauză străină experimentului (carenţe nutritive, infecţii intercurente etc.) - se

---

•) In capitolul de faţă nu prezentăm tehnicile de inoculare pe oul embrionat, una din gazdele folosite pentru izolarea şi studiul rickettsiilor. Aceste tehnici vor fi prezentate la lucrările practice de virusologie.

inoculează numai animale noi, sănătoase (carantinate minimum 3 săptămîni), bine întreţinute. Fiecare lot experimental va fi însoţit de animale martor (animale inoculate cu ser fiziologic pe aceleaşi căi şi în aceleaşi cantităţi ca şi animalele din experiment).

Starea de sănătate a animalelor se apreciază după aspectul general (animale vioaie, cu părul neted şi lucios, bine nutrite, cu ochii limpezi, fără cruste sau scurgeri nazale sau otice, fără tulburări digestive) şi temperatură. Experimentatorul trebuie să cunoască manifestările morbide ale bolilor spontane ale animalelor cu care lucrează.

(1) Contenţia animalelor de laborator

Cunoaşterea modalităţilor de contenţie şi imobilizare a animalelor de laborator este indispensabilă pentru inocularea lor corectă şi în condiţii de securitate.

Cobaiul: cu o mînă se apucă de centura scapulară cuprinzînd toracele şi membrele anterioare. Cealaltă mînă cuprinde centura pelvină (fig.27).

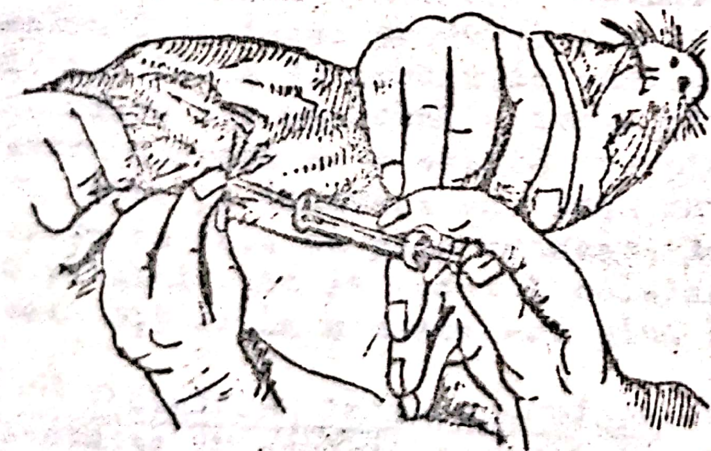


Fig.27 Contenţia manuală a cobaiului în vederea inoculării

Soarecele: trebuie manipulat cu atenţie deoarece muşcă. Se prinde de vîrful cozii între index şi policele mîinii drepte. Se pune animalul pe masă sau capacul borcanului şi se apucă de pielea cefei cu indexul şi policele mîinii stîngi (fig.28 a). In final se imobilizează în mîna stîngă după cum se vede în figura 28 b.

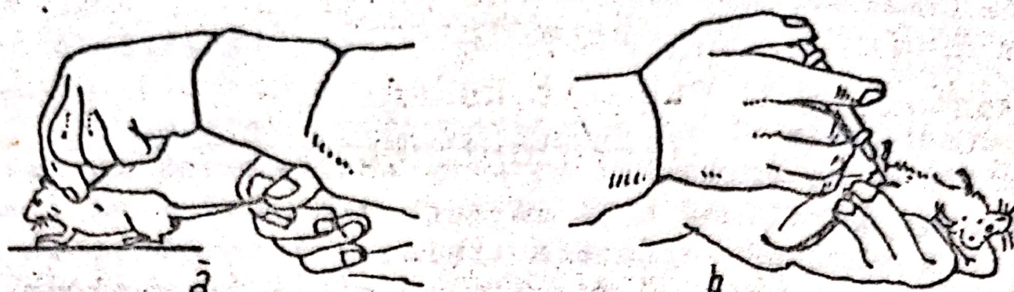


Fig.28 Contenţia manuală a şoarecelui în vederea inoculării

In lipsa unui ajutor imobilizarea se poate face cu ajutorul unor dispozitive speciale (fig.29 şi 3o)

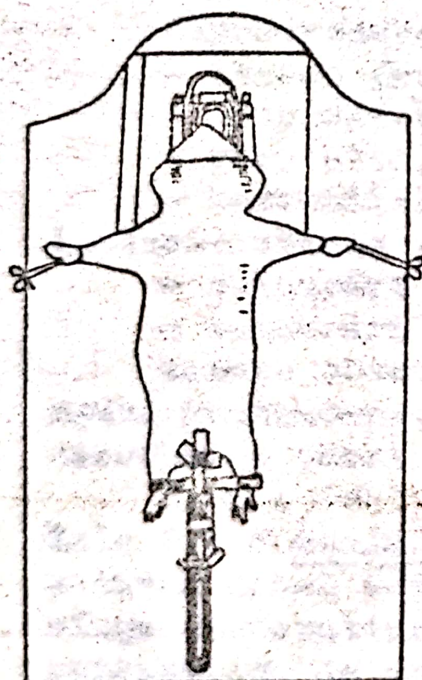


Fig.29 Imobilizarea cobaiului în aparat Latapie



Fig.3o Dispozitiv pentru imobilizarea şoarecelui în vederea inoculării intravenoase

(2) Marcarea

Animalele alese pentru inoculare sînt marcate prin vopsire şi prin etichetarea cuştilor şi borcanelor în care sînt introduse loturile de animale inoculate. Este o condiţie esenţială pentru urmărirea rezultatelor experimentului.

(3) Inocularea

Inocularea se face cu seringi și ace sterile după prealabila antiseptizare a tegumentului cu tinctură de iod.

Materialul microbian de inoculat poate fi reprezentat de:

- culturi microbiene în mediu lichid sau suspensii în ser fiziologic ale culturilor pe medii solide;
- filtrate de culturi microbiene;
- produse patologice, ca atare sau suspensionate în ser fiziologic.

Inocularea intra-dermică este calea de elecție pentru testarea toxinelor cu efect dermonecrotic sau pentru cercetarea stărilor de sensibilizare (iepure, cobai). Se face pe flancurile epilate. Pielea este fixată între police și index și cu un ac fin se inoculează încet o,1-o,2 ml produs. La locul de inoculare se produce o mică bulă iar pielea se decolorează luînd aspectul de coajă de portocală.

Inocularea subcutanată. Pe această cale se inoculează culturi microbiene sau toxine. Este calea de elecție pentru inocularea produselor patologice cu floră de asociație. Flora de asociație rămîne cantonată la locul de inoculare iar microbul patogen pătrunde în circulație. Pentru șoareci se practică sub pielea spatelui, iar pentru cobai pe flancuri sau fața internă a coapsei. Cu 2 degete se face un pliu cutanat. Acul se introduce la baza pliului pînă în țesutul celular subcutanat. Se inoculează o,5 ml la șoarece sau pînă la 1-2 ml la cobai.

Inocularea intra-musculară. Pentru șoarece poate fi efectuată în mușchii coapsei iar pentru cobai în mușchii coapsei sau ai cefei. Se practică la fel ca și inocularea subcutanată acul fiind însă introdus în masa musculară. Se inoculează (cca O,1-o,2 ml la șoarece și cca 1 ml la cobai) pe această cale toxine sau culturi microbiene. Este calea de elecție pentru cercetarea patogenită-

ţii clostridiilor.

Inocularea intra-peritoneală. Se efectuează sub-ombilical şi paramedian. Acul se introduce pe o distanţă de cca 1 cm subcutanat apoi se dă o înclinare spre verticală şi se perforează peretele muscular. Se inoculează cca 1 ml la şoarece şi cîţiva ml la cobai. Este o cale de inoculare severă folosită în general pentru produse patologice monomicrobiene.

Inocularea intra-venoasă se practică la şoarece în venele cozii, la cobai în vena safenă internă iar la iepure în vena marginală a urechii.

(4) Supravegherea animalelor inoculate

Supravegherea animalelor inoculate se face urmărind
- starea generală (poziţia, aspectul părului),
- temperatura,
- greutatea,
- leziunile [redacted] de la locul de inoculare, inclusiv starea ganglionilor limfatici regionali,
- tulburări nervoase (convulsii, paralizii),
- tulburări digestive etc.

Aceste observaţii se completează, după caz, cu examenul anatomo-patologic şi bacteriologic al animalului necropsiat (mort spontan sau sacrificat).

Dacă a fost inoculată o bacterie virulentă, animalele fac o boală septicemică mortală. In acest caz, obiectivul final este evidenţierea bacteriei respective în sînge (hemocultură) şi organe (examenul microscopic al amprentelor de splină, ganglioni etc.).

Dacă a fost inoculată o bacterie toxigenă sau numai toxina acesteia animalele fac o toxiinfecţie, respectiv intoxicaţie. Inocularea în paralel a unui animal protejat cu ser antitoxic permite, pe baza înaltei specificităţi a reacţiei de neutralizare, identificarea precisă a bacteriei toxigene inoculate. Animalul neprotejat moare cu semnele caracteristice intoxicaţiei iar dintre animalele protejate cu ser antitoxic supravieţuieşte doar a-

cela care este protejat cu serul corespunzător toxinei inoculate.

(5) Necropsia

Animalele sînt necropsiate în maximum 1-2 ore după moarte sau sacrificare pentru a evita invadarea organismului de către flora de putrefacţie.

Material necesar

- tavă de tablă cu margini perforate pentru fixarea animalului (cobai, iepure); pentru fixarea şoarecilor se poate utiliza o simplă planşetă de scîndură;
- instrumente de mică chirurgie (3 bisturie, 4 penze anatomice, 4 foarfece, sonde canelate) sterilizate;
- soluţie 1% bromocet, alcool iodat, vată;
- cutii Petri sterile, pipete Pasteur, lame de microscop, ansă, medii de cultură (bulion glucozat, geloză sînge etc.), lampă de spirt sau bec de gaz;
- mănuşi pentru cazul în care se necropsiază animale inoculate cu bacterii foarte patogene.

Necropsia

Animalul de necropsiat se fixează pe tava de necropsie cu faţa ventrală în sus. Şoarecele mort poate fi fixat pe planşeta de lemn cu bolduri trecute prin lăbuţe.

Se badijonează insistent toată faţa ventrală cu soluţie 1% bromocet. Prin aceasta nu sînt distruse în totalitate microorganismele de la suprafaţa corpului dar este prevenită eficient contaminarea aerului şi suprafeţelor cu praful şi perii din blană în cursul incizării tegumentelor.

Cu un rînd de instrumente sterile (foarfece, pensă, sondă canelată) se face o incizie mediană a tegumentelor submetopubiană şi cîte 2 incizii spre rădăcina memrelor (fig.31 A). Se decolează pielea pînă pe flancuri. Se examinează ţesutul celular subcutanat, masele musculare şi ganglionii limfatici, în special ai regiunii inoculate.

Cu un nou rînd de instrumente sterile se face o incizie transversală paralelă cu rebordul costal şi 2 incizii laterale secţionînd coastele. Se ridică plastronul costal. Se evidenţiază astfel organele toracice.

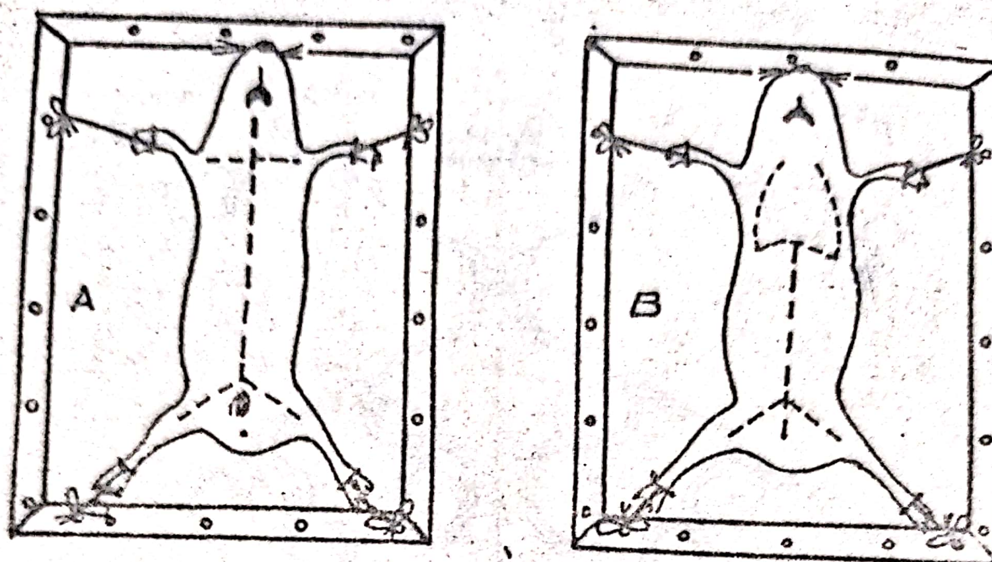


Fig.31 Fixarea animalelor de laborator pentru necropsie A - traiectul inciziilor tegumentului; B - traiectul inciziilor planului musculo-aponevrotic pentru deschiderea cavităţilor toracică şi abdominală

Pentru hemocultură, se imobilizează vîrful cordului cu pensa şi se puncţionează cu o pipetă Pasteur, după cauterizarea suprafeţei de puncţie cu o spatulă. Se recoltează o cantitate de sînge, care se ridică prin capilaritate în pipetă, şi se însămînţează în bulion glucozat şi pe geloză sînge.

Se deschide apoi abdomenul (fig.31 B). Se examinează organele abdominale. Utilizînd alt rînd de instrumente, se scoate splina şi se depune într-un Petri steril. După caz, similar, sînt abordate şi celelalte organe ale cavităţii abdominale (ficat, rinichi etc.) şi toracelui. Organele recoltate se secţionează steril şi se fac însămînţări pe medii de cultură adecvate şi amprente pentru examenul microscopic.

După necropsie, cadavrul este acoperit cu un tifon şi totul bine umezit cu soluţie dezinfectantă. In final este incinerat. Instrumentarul, tăvile de necropsie şi găleţile în care au fost transportate cadavrele sînt sterilizate prin autoclavare sau fierbere prelungită.

PARTEA A TREIA

REACTII ANTIGEN-ANTICORP

> Antigen este orice substanţă care (a) ajunsă în organismul animal stimulează formarea de anticorpi cu care (b) este capabilă să reacţioneze (să se cupleze) specific atît *in vivo* cît şi *in vitro*.

> Anticorpii sînt atît imunglobuline cît şi limfocite specific sensibilizate purtătoare de sedii de „recunoaştere" şi cuplare specifică (fig.32) elaborate de sistemul imunoformator ca urmare a pătrunderii în organism a unui antigen.

Mecanismul cuplării antigen-anticorp. Cînd antigenul şi anticorpul corespunzător sînt puşi în contact, între grupările determinante şi zonele de combinare se stabilesc legături multiple (forţe de artacţie electrostatică, forţe van der Waals, punţi de hidrogen) favorizate de complementaritatea structurală (fig.33).

Prin realizarea legăturii antigen-anticorp numărul grupărilor polare hidrofile se reduce; complexul devine sensibil la acţiunea floculantă a electroloţilor.

Antigenul şi anticorpul se unesc în proporţii variabile datorită polivalenţei antigenului şi bivalenţei anticorpului (IgG). Proprietăţile complexului format diferă cu raportul cantitativ dintre antigen şi anticorp (fig.34)

In zona de echivalenţă rămîn nesaturate atît valenţe ale antigenului cît şi ale anticorpului. Complexul format se poate mări prin adăugarea de noi şi noi molecule de antigen şi anticorp. El prezintă o structură spaţială în care numărul grupărilor polare este considerabil redus.

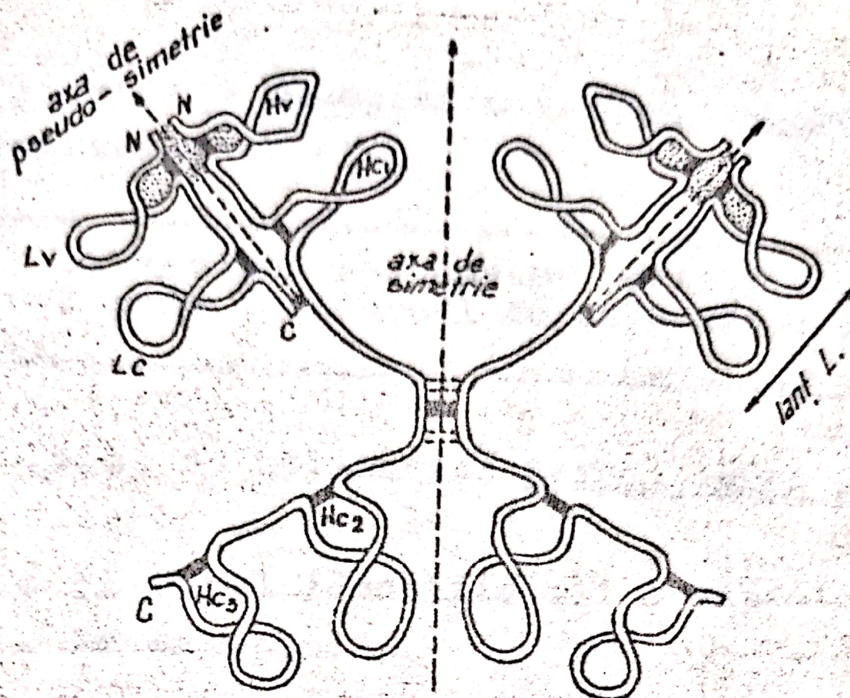


Fig.32 Prezentare schematică a moleculei de imunoglobulină G (după Raynaud, 1971): H=lanțul polipeptidic greu; L=lanțul polipeptidic ușor; v=zonă variabilă; c=zonă constantă; N=azot terminal; ▬ =punți S-S; :::: =punți S-S cu poziție variabilă la diferite clase de Ig; în gri limita „poziției anticorp" (zonei de cuplare)

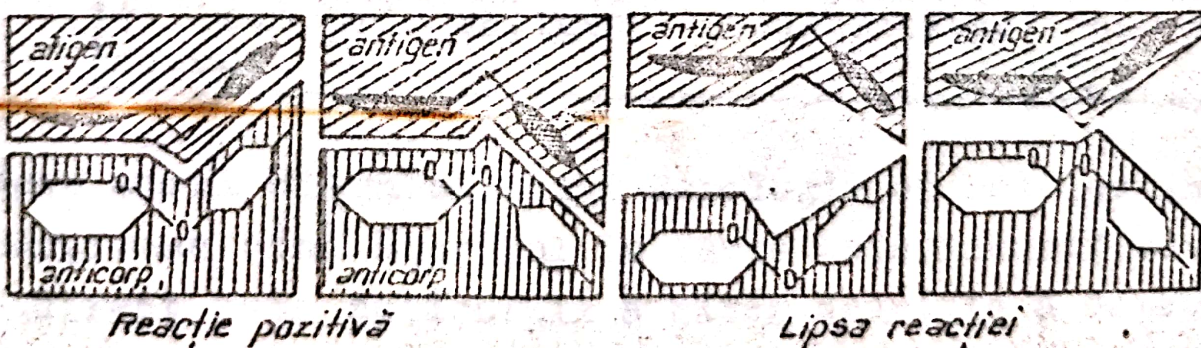


Fig.33 Cuplarea specifică antigen-anticorp (schematic)

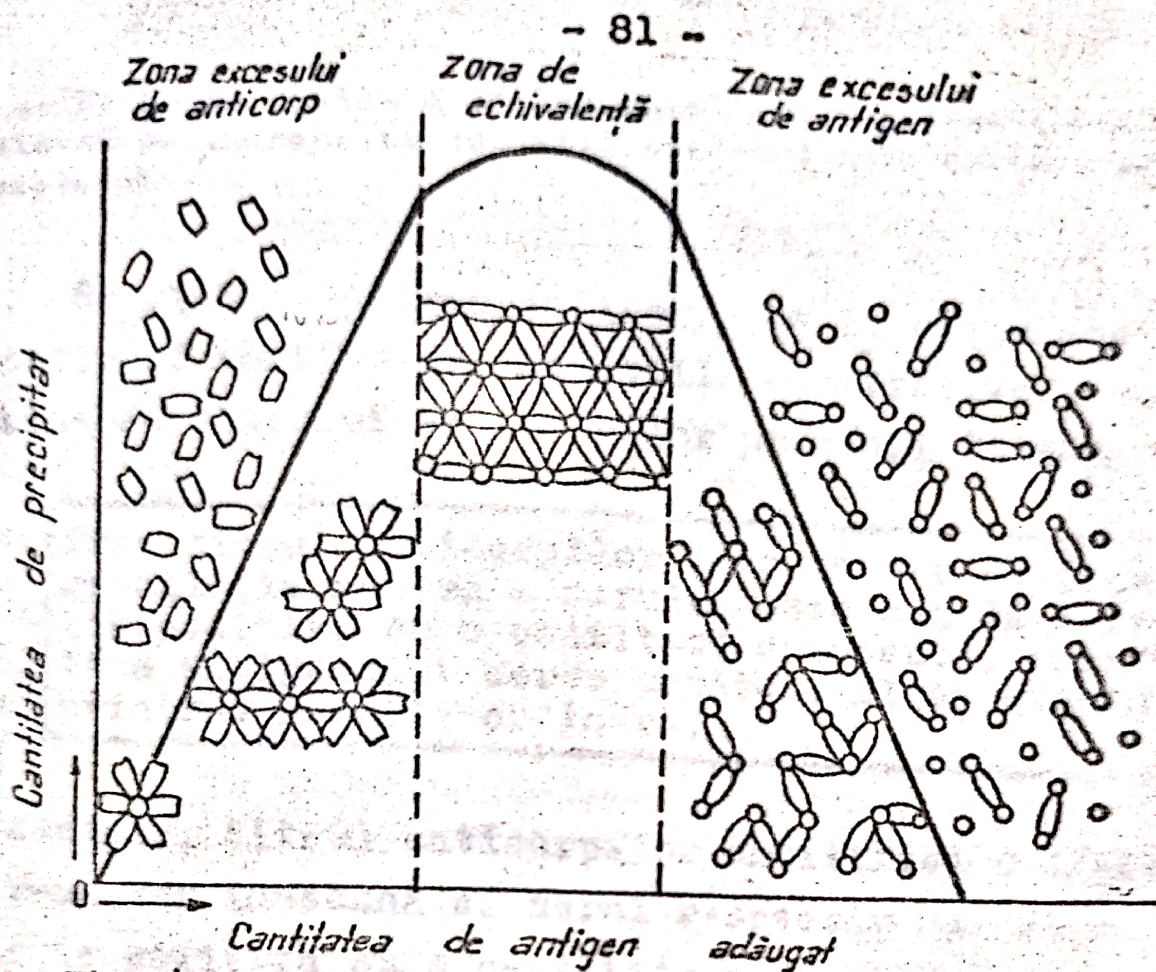


Fig.34 Semnificația raporturilor cantitative în reacția antigen-anticorp

In consecință, sensibilitatea sa la acțiunea floculantă a electroliților este maximă. In zona de echivalență capacitatea complexului de a fixa complementul este maximă iar neutralizarea unei toxine prin antitoxina corespunzătoare este totală.

In zona excesului de anticorpi sau a excesului de antigen rămîn nesaturate valențe ale elementului în exces. Complexele formate prezintă o structură spongioasă, au o sensibilitate mai redusă la acțiunea floculantă a electroliților. In aceste zone cantitatea precipitatului format scade proporțional cu excesul de antigen sau anticorp. De asemenea capacitatea complexului de a fixa complementul.

Aplicațiile reacției antigen-anticorp decurg din specificitatea ei:

(i) Un antigen necunoscut poate fi identificat prin anticorpul corespunzător cunoscut.

In acest scop se utilizează seruri imune de referință.

Este și cazul identificării antigenice a microbilor. De exemplu:

Ag (necunoscut, bacil) + Ac (antitific, de exemplu) = reacție + (Ag este bacil tific)

= reacție - (Ag nu este bacil tific)

(ii) Un anticorp necunoscut poate fi identificat prin antigenul corespunzător cunoscut.

Este cazul diagnosticului serologic al bolilor infecțioase cînd microbul în cauză este identificat indirect prin anticorpii a căror apariție a determinat-o.

Rezultatul reacțiilor antigen-anticorp este influențat de proporția antigenului și anticorpului din amestec, de viteza cu care sînt amestecați reactivii, de prezența electroliților, de pH, temperatura de incubare a reacției

ş.a. De aceea pentru a obţine rezultate reproductibile trebuie să se lucreze în condiţii standard care trebuie strict respectate.

Reacţiile antigen-anticorp pot fi executate calitativ şi cantitativ. Reacţiile cantitative permit evaluarea titrului anticorpilor prezenţi într-un ser.

> Prin titrul anticorpilor într-un ser se înţelege diluţia maximă a serului care mai dă o reacţie pozitivă cu o cantitate cunoscută, constantă a antigenului corespunzător. El se exprimă printr-o fracţie ordinară.

De exemplu, titrul anticorpilor antitifici O 1/4oo într-un ser înseamnă că serul respectiv mai dă o reacţie pozitivă cu o cantitate cunoscută, constantă, de antigen tific O pînă la diluţia 1/4oo.

Tipuri de reacţii antigen-anticorp în funcţie de natura antigenului şi de modalităţile tehnice de evidenţiere a reacţiei antigen-anticorp in vitro deosebim:

- Reacţia de precipitare, care se produce între un antigen în soluţie coloidală şi anticorpul corespunzător şi are ca rezultat insolubilizarea antigenului cu apariţia unui precipitat sau floculat.
- Reacţia de aglutinare are loc între un antigen integrat în structura unei celule şi anticorpul corespunzător. Rezultatul reacţiei este constituirea

unui agregat vizibil de celule (de exemplu, bacterii), aglutinat care se depune la fundul tubului cu clarificarea consecutivă a supernatantului.

- Reacţia de fixare a complementului.

- Reacţii cu anticorpi marcaţi în care cuplarea antigenului cu anticorpul se vizualizează în preparate microscopice folosind anticorpi marcaţi fluorescent (microscopie în ultraviolet) sau cu substanţe electronoopace (microscopie electronică).

Reacţii de neutralizare a unor toxine microbiene sau a unor exoenzime.

6 CERCETAREA STRUCTURII ANTIGENICE A BACTERIILOR

Pentru cercetarea structurii antigenice a microbilor (identificare antigenică) se utilizează truse cu seruri de referință - seruri cu anticorpi cunoscuți.

Seruri monospecifice. Microbi din specii diferite pot poseda un antigen comun. Astfel, un ser imun corespunzător unei specii aglutinează, precipită ș.a. atît suspensii și respectiv extracte antigenice ale speciei omoloage cît și ale tuturor bacteriilor cu care aceasta posedă antigene comune. Aceste reacții se numesc reacții încrucișate.

Să presupunem că bacteria 1 are configurația antigenică X Y Z, bacteria 2 - M N Z, iar bacteria 3 - T U Z. Serul imun obținut prin inocularea bacteriei 1 la un animal de experiență conține anticorpi anti-X, anti-Y și anti-Z. Posedînd anticorpi anti-Z, acest ser va aglutina suspensiile tuturor bacteriilor care posedă antigenul Z (bacteriile 1, 2, 3 ș.a.). La fel, va precipita cu extracte antigenice ale acestor bacterii.

Dacă aglutinatul care apare cînd se suspensionează bacteria 2 în serul imun corespunzător bacteriei 1 este îndepărtat prin centrifugare, odată cu bacteria 2 sînt îndepărtați din ser și anticorpi anti-Z. Această operație se numește absorbția anticorpilor. Ea poate fi repetată pînă în momentul în care serul imun anti-bacteria 1 nu va mai reacționa cu bacteria 2 sau cu orice altă bacterie care conține antigen Z. Un asemenea ser este un ser monospecific; el reacționează numai cu bacteria omoloagă.

Serurile monospecifice sînt seruri imune de referință. Ele se obțin din seruri imune native prin absorbția anticorpilor heterologi.

(i) Gruparea serologică a streptococilor β-hemolitici prin reacția de precipitare inelară

Material necesar

- tuburi de precipitare (tuburi de sticlă cu calibrul de 3-4 mm) și stativ,
- pipete Pasteur,
- extract antigenic streptococic (prepararea acestui extract după metoda Lancefield este schematizată în fig. 35),
- seruri imune anti-streptococice de grup A, C, G.

Tehnica

- Se pipetează, separat, în 3 tuburi de precipitare cîte o mică cantitate (cca o,1 ml) din serurile anti-streptococice de grup A, C, G.
- Se pipetează cca o,1-o,2 ml din extractul antigenic în fiecare tub, deasupra serului, cu grija ca cei 2 reactivi să nu se amestece, astfel încît limita de separare să rămînă bine vizibilă.
- Citirea se face pe fond negru după cîteva minute. In tubul care conține antiserul omolog antigenului testat apare un precipitat lăptos inelar la limita dintre cei doi reactivi. In celelal-

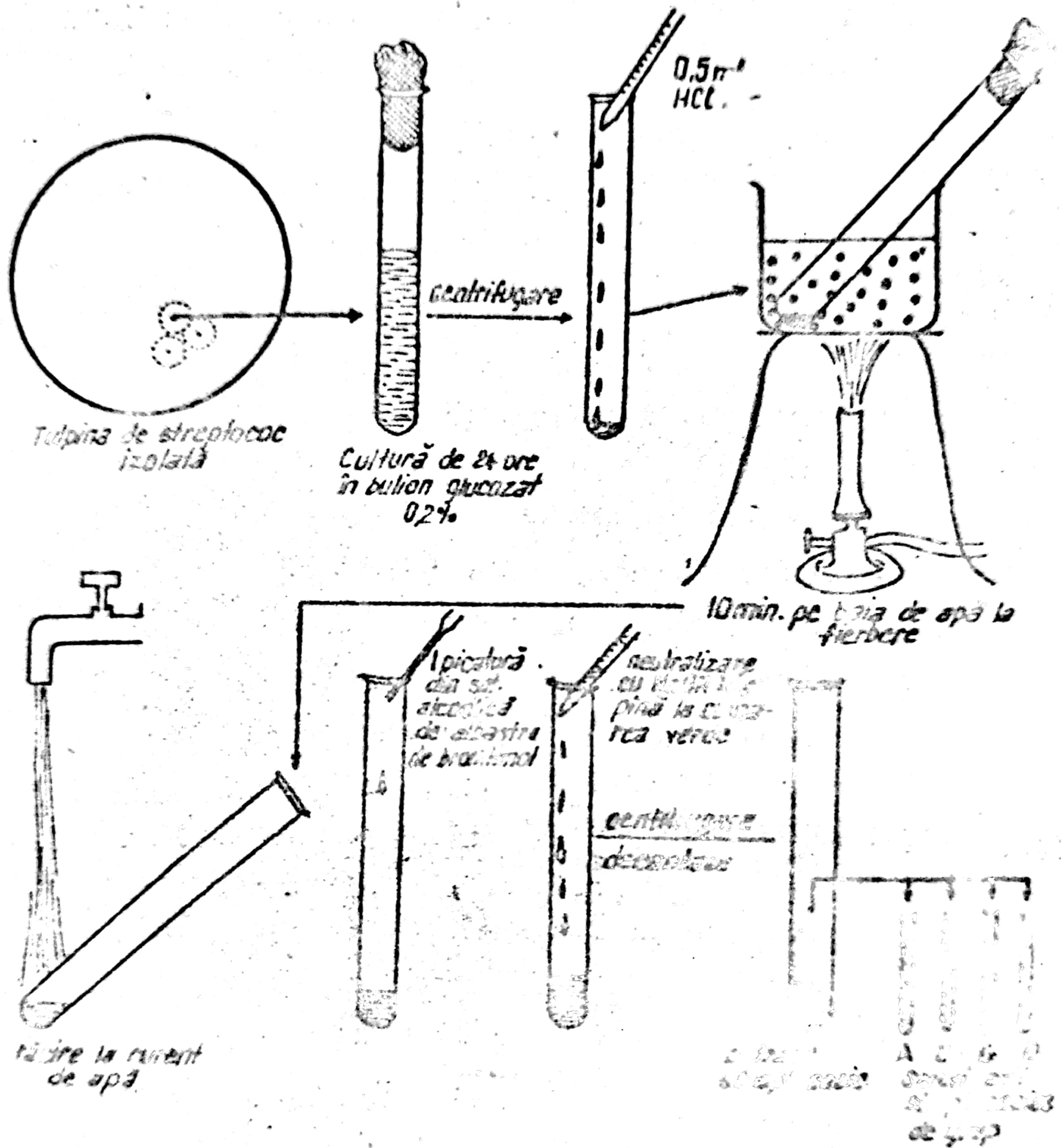


Fig.35 Gruparea serologică a streptococilor
prin metoda Lancefield

te tuburi nu trebuie să apară precipitare, reactivii rămîn perfect clari*).

Notă

1 - Dacă cultura din care se prepară extractul nu este pură pot apare rezultate fals pozitive sau fals negative.

2 - Extractul antigenic trebuie neutralizat imediat deoarece polizaharidul streptococic de grup nu este stabil în mediu acid.

3 - Dacă extractul antigenic nu este bine neutralizat pot apare reacţii fals negative.

4 - Reactivii trebuie să fie perfect clari.

(ii) Depistarea şi identificarea prin reacţia de precipitare inelară a antigenelor bacteriene în lichidul cefalo-rahidian (lcr)

Prin reacţia de precipitare inelară se poate stabili diagnosticul etiologic al unor meningite bacteriene atunci cînd culturile rămîn negative.

Material necesar

- tuburi de precipitare,

- pipete Pasteur,

- seruri anti-bacteriene (seruri anti-meningococice, anti-*Haemophilus influenzae* ş.a.),

- lcr: supernatantul perfect clar după centrifugare 5 min. la 3000 rpm.

---

*) vezi nota de la subsolul pag.89

Tehnica

Se efectuează o reacţie de precipitare inelară în condiţiile descrise mai sus (vezi punctul i)*)

(iii) Demonstrarea in vitro a toxigenezei bacilului difteric prin metoda imunodifuziei (testul Elek)

Intr-o cutie Petri se repartizează un mediu favorabil cultivării şi toxigenezei bacilului difteric (de exemplu, geloză nutritivă cu 20% ser normal de cal). De-a lungul unuia din diametrele plăcii se aplică o bandă de hîrtie de filtru de 1 cm/8 cm sterilă şi îmbibată cu ser antidifteric (nefenolat) conţinînd minumum 500 UA/ml. După ce se usucă suprafaţa mediului, perpendicular pe direcţia

*)Reacţia se poate efectua mai economic în tuburi capilare (1-1,2 mm diametru/ 75-100 mm lungime). Se introduce extremitatea capilarului în serul imun şi se absoarbe prin capilaritate o coloană de cca 2 cm. Se şterg cu grijă urmele de ser de la exteriorul tubului pentru a nu degrada antigenul. Se introduce aceeaşi extremitate a tubului în extractul antigenic şi se absoarbe o cantitate egală. Se şterg urmele de antigen de la exteriorul tubului. Se implantează tubul, cu coloana de ser în sus, în plastilină astfel încît deasupra şi dedesubtul coloanei de reactiv să existe un spaţiu cu aer. Se repetă operaţia pentru fiecare ser imun din baterie. Citirea se face după 15-30 min. la temperatura camerei cu ochiul liber sau cu lupa de mînă pe fond negru: se urmăreşte apariţia inelului de precipitare. Citirea finală se face după menţinerea 2 ore la 37°C şi peste noapte la frigider: se urmăreşte existenţa unui precipitat la partea inferioară a coloanei sau pe pereţii tubului.

Tehnica

Se efectuează o reacţie de precipitare inelară în condiţiile descrise mai sus (vezi punctul i)*)

(iii) Demonstrarea *in vitro* a toxigenezei bacilului difteric prin metoda imunodifuziei (testul Elek)

Intr-o cutie Petri se repartizează un mediu favorabil cultivării şi toxigenezei bacilului difteric (de exemplu, geloză nutritivă cu 2o% ser normal de cal). De-a lungul unuia din diametrele plăcii se aplică o bandă de hîrtie de filtru de 1 cm/ 8 cm sterilă şi îmbibată cu ser antidifteric (nefenolat) conţinînd minumum 5oo UA/ml. După ce se usucă suprafaţa mediului, perpendicular pe direcţia

*)Reacţia se poate efectua mai economic în tuburi capilare (1-1,2 mm diametru/ 75-loo mm lungime). Se introduce extremitatea capilarului în serul imun şi se absoarbe prin capilaritate o coloană de cca 2 cm. Se şterg cu grijă urmele de ser de la exteriorul tubului pentru a nu degrada antigenul. Se introduce aceeaşi extremitate a tubului în extractul antiganic şi se absoarbe o cantitate egală. Se şterg urmele de antigen de la exteriorul tubului. Se implantează tubul, cu coloana de ser în sus, în plastilină astfel încît deasupra şi dedesubtul coloanei de reactiv să existe un spaţiu cu aer. Se repetă operaţia pentru fiecare ser imun din baterie. Citirea se face după 15-3o min. la temperatura camerei. cu ochiul liber sau cu lupa de mînă pe fond negru: se urmăreşte apariţia inelului de precipitare. Citirea finală se face după menţinerea 2 ore la 37°C şi peste noapte la frigider: se urmăreşte existenţa unui precipitat la partea inferioară a coloanei sau pe pereţii tubului.

benzii de hîrtie îmbibată cu antitoxină se însămînțează cîte o strie din fiecare cultură de cercetat, un martor pozitiv şi unul negativ. Se incubează la 37°C şi se examinează placa după 24 şi 48 ore. Antitoxina (anticorpul) şi toxina (antigenul) difuzează radiar din depozitele respective şi în locul unde se întîlnesc în proporţii echivalente dau arcuri de precipitare (fig.36).

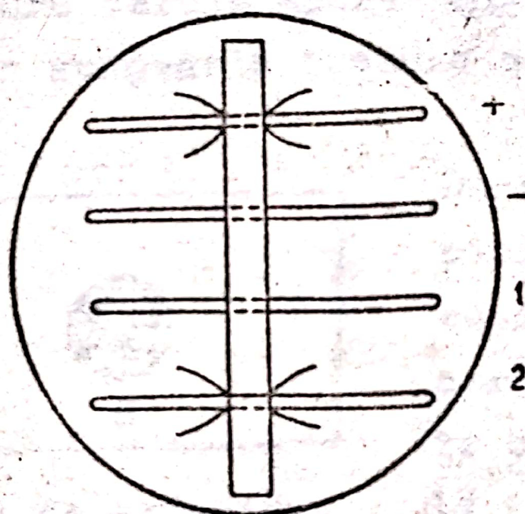


Fig.36 Evidenţierea toxigenezei bacilului difteric prin reacţia de imunodifuzie (testul Elek): a-bandă de hîrtie de filtru impregnată cu antitoxină difterică; + = cultură a unei tulpini toxigene cunoscute (martor pozitiv); - = cultură a unei tulpini netoxigene cunoscute (martor negativ) 1 = cultură testată (netoxigenă); 2 = cultură testată (toxigenă)

(2) Reacţia de aglutinare

(i) Identificarea antigenică a bacteriilor prin reacţia de aglutinare pe lamă

Este o etapă esenţială în identificarea practică a unor bacterii, în primul rînd a numeroaselor Enterobacteriaceae.

Material necesar

- lame de microscop,
- ansă,
- cultura pe mediu solid (geloză nutritivă sau medii diferenţiale) a bacteriei de identificat,
- trusă de seruri imune*) diluate la titrul aglutinant pe lamă.

Tehnica

Bacteria se testează succesiv faţă de seruri polivalente apoi faţă de serurile monovalente (monospecifice) cuprinse în serul polivalent cu care a aglutinat.

- La extremităţile unei lame de microscop se depune cîte o picătură din serurile imune.

- In fiecare picătură, pe rînd, se omogenizează o ansă de cultură. Cantitatea de cultură trebuie să fie suficientă pentru a da o suspensie cu densi-

*) Amănunte privind trusele de seruri imune livrate de Institutul Cantacuzino, Bucureşti în scopul identificării Enterobacteriaceae-lor şi a altor bacterii sînt date în capitolele părţii a V-a a cărţii.

tate medie. Omogenizarea se face fără a împrăştia picătura, cu mişcări lente ale ansei pentru a evita formarea de aerosoli contaminanţi.

- Aglutinarea pozitivă este vizibilă cu ochiul liber în timpul suspensionării culturii. Aglutinările mai tardive nu se iau în consideraţie.

- Lamele pe care s-a efectuat reacţia sînt depuse într-un vas cu soluţie dezinfectantă.

Microbul este identificat antigenic de către serul în picătura căruia apare aglutinarea. In restul picăturilor suspensia trebuie să rămînă omogenă (fig.37).

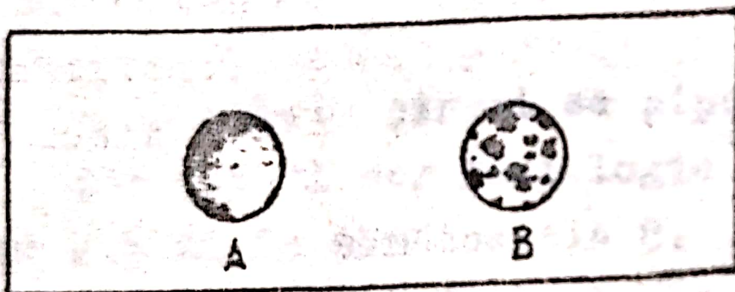


Fig.37 Reacţia de aglutinare pe lamă. A-reacţie negativă; B-reacţie pozitivă. In A ser anti-Salmonella grup A în B ser anti-Salmonella grup B. Bacteria studiată este deci o salmonellă grup B

Dacă în primele 2 picături se obţine consecutiv aglutinarea, cultura este autoaglutinabilă (forma R), fapt care se poate verifica prin suspensionarea ei într-o picătură de sol. 1/5oo acriflavină în ser fiziologic. Reacţia nu se continuă cu restul serurilor - o asemenea cultură nu poate fi identificată antigenic prin reacţia de aglutinare.

Aglutinarea pe lamă este o reacţie de identificare orientativă. Pentru identificarea finală,

rezultatele ei se verifică prin aglutinarea în tub.

(ii) Reacţia de aglutinare în tuburi

Prin aglutinare pe lamă se obţin uneori reacţii încrucişate deoarece

- este imposibilă absorbţia completă a anticorpilor responsabili de reacţiile încrucişate,
- titrul aglutinant pe lamă al serurilor imune este redus şi nu permite diferenţierea aglutinărilor prin anticorpii specifici de cele prin anticorpii responsabili de aglutinările încrucişate (incomplet absorbiţi).

De aceea, pentru identificarea finală este necesar a efectua reacţia de aglutinare în tub (reacţie cantitativă şi mult mai sensibilă) cu fiecare ser care a dat reacţie pozitivă pe lamă.

In final, tulpina este identificată de serul care o aglutinează în tub pînă la titrul marcat pe fiolă.

Material necesar

- tuburi de aglutinare (12/12o mm) şi stative,
- suspensia inactivată a bacteriei de identificat standardizată nefelometric,
- seruri de referinţă,
- ser fiziologic,
- pipete gradate (1 ml şi 5 ml),
- baie de apă.

Inactivarea suspensiilor bacteriene se face diferenţiat.

Pentru aglutinarea H: în tubul cu cultura de 18-24 ore în bulion nutritiv a bacteriei testate se adaugă ci-

teva picături de formol. Se ajustează cu ser fiziologic la o densitate de $250-300 \cdot 10^6$/ml (corespunzător tubului 1 din scara Brown).

Pentru aglutinarea O: cultura de 18-24 ore pe geloză înclinată a bacteriei testate este spălată cu cca 1 ml ser fiziologic care se transvazează apoi într-un tub steril şi se inactivează 10 min. pe baia de apă la fierbere. Se ajustează cu ser fiziologic la o densitate de $250-300 \cdot 10^6$/ml.

Tehnica

In exemplul pe care îl alegem bacteria testată a aglutinat pe lamă cu 2 din serurile monovalente (monospecifice).

- Se pun în stativ 2 şiruri a cîte 9 tuburi de aglutinare, cîte un şir pentru fiecare ser monospecific.

- In ambele şiruri se pipetează (cu pipeta de 5 ml) 0,9 ml ser fiziologic în primul tub şi cîte 0,5 ml în următoarele 8.

- Cu o pipetă de 1 ml, se pipetează 0,1 ml ser monospecific în primul tub al primului şir; se amestecă prin agitare; se obţine astfel diluţia 1/10 a serului respectiv.

- Cu o nouă pipetă de 1 ml, se trece din primul tub în al doilea 0,5 ml; se amestecă; cu aceeaşi pipetă se trec 0,5 ml din tubul al doilea în al treilea, se amestecă şi tot aşa pînă la tubul al 8-lea din care se aruncă 0,5 ml; sînt obţinute astfel următoarele diluţii de ser:

Nr.tub	1	2	3	4	5	6	7	8
Diluţia serului	1/1o	1/2o	1/4o	1/8o	1/16o	1/32o	1/64o	1/128o

- Se procedează la fel pentru diluarea celui de al doilea ser monospecific.
- Cu pipeta de 5 ml, se pipetează în toate tuburile cîte 0,5 ml suspensie bacteriană. Se obţin astfel următoarele diluţii finale ale serului de cercetat:

Nr. tub	1	2	3	4	5	6	7	8
Diluţia serului	1/2o	1/4o	1/8o	1/16o	1/32o	1/64o	1/128o	1/256o

- Tuburile se incubează la baia de apă. Temperatura şi timpul de incubaţie variază cu antigenul (în general temperatura de incubaţie este de 37°C; timpul 2 ore pentru reacţiile cu antigene flagelare şi 2o de ore pentru cele cu antigene somatice). Citirea reacţiei se face după scoaterea tuburilor de la baia de apă şi menţinerea lor 3o min. la temperatura camerei.

Pentru citirea reacţiei, fundul tuburilor se plasează deasupra unei oglinzi concave (de exemplu, o oglindă de microscop) sau se foloseşte un aglutinoscop.

In tubul martor suspensia bacteriană trebuie să fie omogenă.

Reacţia pozitivă se traduce prin apariţia unui aglutinat. Gradul de pozitivitate se notează după cum urmează:

++ = particule aglutinate sedimentate la fundul tubului; supernatant clar;

+ = bacteriile aglutinate în grunji vizibili cu ochiul liber; supernatant uşor opalescent;

± = aglutinare parţială vizibilă numai cu oglinda concavă sau la aglutinoscop;

- = aspect identic cu al martorului.

Diluţia maximă la care mai apare o aglutinare (+) reprezintă titrul aglutinant al serului.

SCHEMA REACTIEI DE AGLUTINARE IN TUBURI

Tubul / Diluţia	1	2	3	4	5	6	7	8		Martor antigen
	1/20	1/40	1/20	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560		
ml antigen	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5
	0,5 →	→	→	→	→	→	→	→	→	
ml ser de cercetat	0,1									
ml ser fiziologic	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5

Incubare la 37° C 2 ore pentru reacţiile cu antigene flagelare şi 20 ore pentru reacţiile cu antigene somatice

Fig. 38

(3) Reacţia de imunofluorescenţă directă în identificarea rapidă a microbilor direct în produse patologice

Un frotiu care conţine antigenul cercetat (de exemplu, o bacterie) este acoperit cu o soluţie a anticorpului marcat. După timpul de incubaţie necesar, frotiul este spălat. Dacă reacţia antigen-anticorp a avut loc, anticorpul marcat rămîne pe frotiu iar complexul antigen-anticorp respectiv este vizibil la microscopul cu fluorescenţă (fig.4o A).

Metoda directă este folosită în practica identificării rapide a unor bacterii direct în produse patologice pe baza structurii lor antigenice. Aşa se poate face, de exemplu, identificarea tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli în frotiuri din materii fecale.

7 CERCETAREA ANTICORPILOR LA BOLNAV

In acest capitol ne limităm la conturarea cadrului serodiagnosticului, enumerarea reacţiilor utilizate cu principiul şi indicaţiile lor.

Cei interesaţi asupra amănuntelor tehnice vor putea consulta profitabil bibliografia indicată.

Anticorpii apar în umori ca urmare a unei infecţii aparente (boală infecţioasă) sau inaparente. Ei pot fi decelaţi începînd cu sfîrşitul primei săptămîni de la debutul infecţiei. Odată apăruţi, titrul anticorpilor faţă de microbul infectant urmează o curbă ascendentă apoi descreşte lent putînd fi evidenţiaţi luni şi ani de zile după infecţie; unii anticorpi persistă pentru toată viaţa.

Anticorpi pot să apară în umori şi ca urmare a vaccinărilor.

La bolnavi cu sindroame febrile de origine necunoscută, cercetarea anticorpilor în ser se face în scopul stabilirii indirecte a diagnosticului etiologic al îmbolnăvirii - diagnostic indirect sau serologic (raporturile lui cu diagnosticul direct sau microbiologic ca şi valoarea comparativă a celor 2 metode sînt prezentate cu detalii în capitolul 25).

Avînd în vedere că

în umorile oricărui individ norma. există anticorpi în raport cu experienţa sa infecţioasă (infecţii aparente sau inaparente) şi vaccinările pe care le-a făcut,

trebuie demonstrată legătura cauzală între anticorpii evidenţiaţi şi sindromul febril investigat. Cu rare excepţii, aceasta se poate face numai examinînd concomitent 2 probe de ser recoltate: prima cît mai curînd posibil după diagnosticarea clinică a unei infecţii (ser I sau ser precoce) şi a doua după cca 1o zile de la prima recoltare (ser II sau ser tardiv)

Etiologia unei infecţii este demonstrată prin examen serologic - dacă anticorpii nu sînt prezenţi în serul I dar îşi fac apariţia în serul II sau - dacă titrul anticorpilor în serul II este de cel puţin 4 ori mai mare decît în serul I

Prin reacţii *i n v i t r o*, cel mai frecvent se cercetează prezenţa precipitinelor, aglutininelor şi anticorpilor fixatori de complement. Depistarea anticorpilor prin imunofluorescenţă este de asemenea o metodă utilă.

Alte categorii de anticorpi umorali - antitoxine, antihemolizine, antifibrinolizine - sînt mai rar cercetate din cauza inconstanţei lor sau a dificultăţilor de punere în evidenţă. Depistarea lor este uneori utilă, cum este cazul antistreptolizinei O ca un criteriu secundar de diagnostic al reumatismului articular acut.

Prin reacţii i n v i v o se cercetează în practica de rutină stările de sensibilizare faţă de unele antigene (inclusiv microbiene) precum şi starea de sensibilitate (receptivitate) la unele toxine bacteriene şi respectiv nereceptivitatea la aceste toxine prin existenţa anticorpilor neutralizanţi.

(1) Reacţii de precipitare în serodiagnosticul sifilisului

Deşi anticorpii pot fi evidenţiaţi prin reacţii de precipitare în serurile bolnavilor suferinzi de o serie întreagă de bacterioze, în practică aceste reacţii se utilizează numai pentru serodiagnosticul sifilisului. Se efectuează în paralel reacţii de floculare (VDRL sau Kahn) şi reacţia de fixare a complementului cu antigen cardiolipinic.

(2) Reacții de aglutinare

(i) Diagnosticul unei febre enterice prin reacția de aglutinare

Infecțiile sistemice cu tablou clinic sugestiv pentru o febră enterică sînt determinate cel mai frecvent de Salmonella typhi, S.paratyphi A, S.paratyphi B, S.paratyphi C. Bruceloza poate mima simptomatologia unei febre enterice.

> De aceea, serurile care provin de la un bolnav cu o infecție sistemică ce sugerează febra enterică sînt testate cu o baterie de antigene care include antigenele O și H ale S.typhi, S.paratyphi A, S.paratypi B, S.paratyphi C și antigen Brucella.

Pentru economie de material și timp, în condițiile testării serurilor cu o baterie atît de largă de antigene, în practică se procedează la o testare preliminară de triaj. Serurile sînt testate în două diluții, 1/2o și 1/2oo, față de antigenele Salmonella și în patru diluții, 1/2o, 1/2oo, 1/4oo și 1/8oo, față de antigenul Brucella. Diluțiile sînt astfel alese pentru a evita un eventual fenomen de prozonă - mai frecvent cu anticorpii anti-Brucella - în cazul serurilor cu titruri mari de anticorpi (zona excesului de anticorpi). Retestarea într-o zonă mai largă de diluții se face numai față de antigenele cu care serurile au reacționat în testarea preliminară.

(ii) Alte utilizări ale reacției de aglutinare în serodiagnostic

Se recurge la reacția de aglutinare pentru diagnosticul serologic al tularemiei (aglutinarea unei suspensii de Francisella tularensis), al tifosului exantematic, tifosului murin ş.a.

Inrudirea antigenică existentă între majoritatea rickettsiilor şi tulpinile X de Proteus*) permite diagnosticarea unora dintre rickettsioze prin reacția de aglutinare în care se utilizează ca antigen suspensia de Proteus X - reacția Weil-Felix. Serurile bolnavilor de tifos exantematic şi tifos murin aglutinează bine suspensia de Proteus X_{19}

In diagnosticul serologic al rickettsiozelor poate fi folosită şi reacția de aglutinare specifică a antigenelor rickettsiene corpusculare spălate de antigenul solubil de grup. Aceste antigene însă nu sînt destinate serologiei de rutină.

(3) Reacția de fixare a complementului (RFC)

Complementul (C') sau alexina este un complex termolabil prezent în serul normal şi care se adsoarbe, în prezența ionilor de calciu şi magneziu, pe complexul antigen-anticorp. In absența complexului antigen-anticorp, C' nu se adsoarbe separat

*) Tulpinile X sînt o variantă „O" a speciei Proteus vulgaris

nici pe antigen, nici pe anticorp (fig.39).

Fixarea C' pe complexele antigenelor microbiene cu anticorpii omologi nu este vizibilă cu ochiul liber (bacterioliza care se produce în reacţiile cu unele bacterii - vibrionul holeric ş.a. - este dificil de urmărit).

Fixarea C' pe complexele hematiilor de oaie cu anticorpii omologi determină hemoliza, modificare vizibilă cu ochiul liber.

Adsorbţia sau „fixarea" C' pe complexul antigen-anticorp poate fi evidenţiată prin cuplarea în timpi succesivi a 2 reacţii antigen-anticorp care îşi dispută C' ca element comun.

Intr-un prim timp se realizează reacţia propriuzisă prin amestecarea antigenului şi anticorpului cu o cantitate determinată de complement*). Amestecul este incubat pentru perioada de timp necesară desfăşurării reacţiei (de exemplu, 1 oră la 37°C sau 18 ore la 4°C).

In al doilea timp este testată fixarea C' printr-un sistem indicator (sistemul hemolitic): suspensie de hematii de oaie-ser hemolitic antioaie

---

*) Ca C' se foloseşte serul proaspăt sau conservat de cobai. Pentru ca la acţiunea C' introdus în reacţie să nu se însumeze şi acţiunea C' existent în serul de cercetat, se procedează în prealabil la inactivarea termică a serului timp de 30 min. la 56°C.

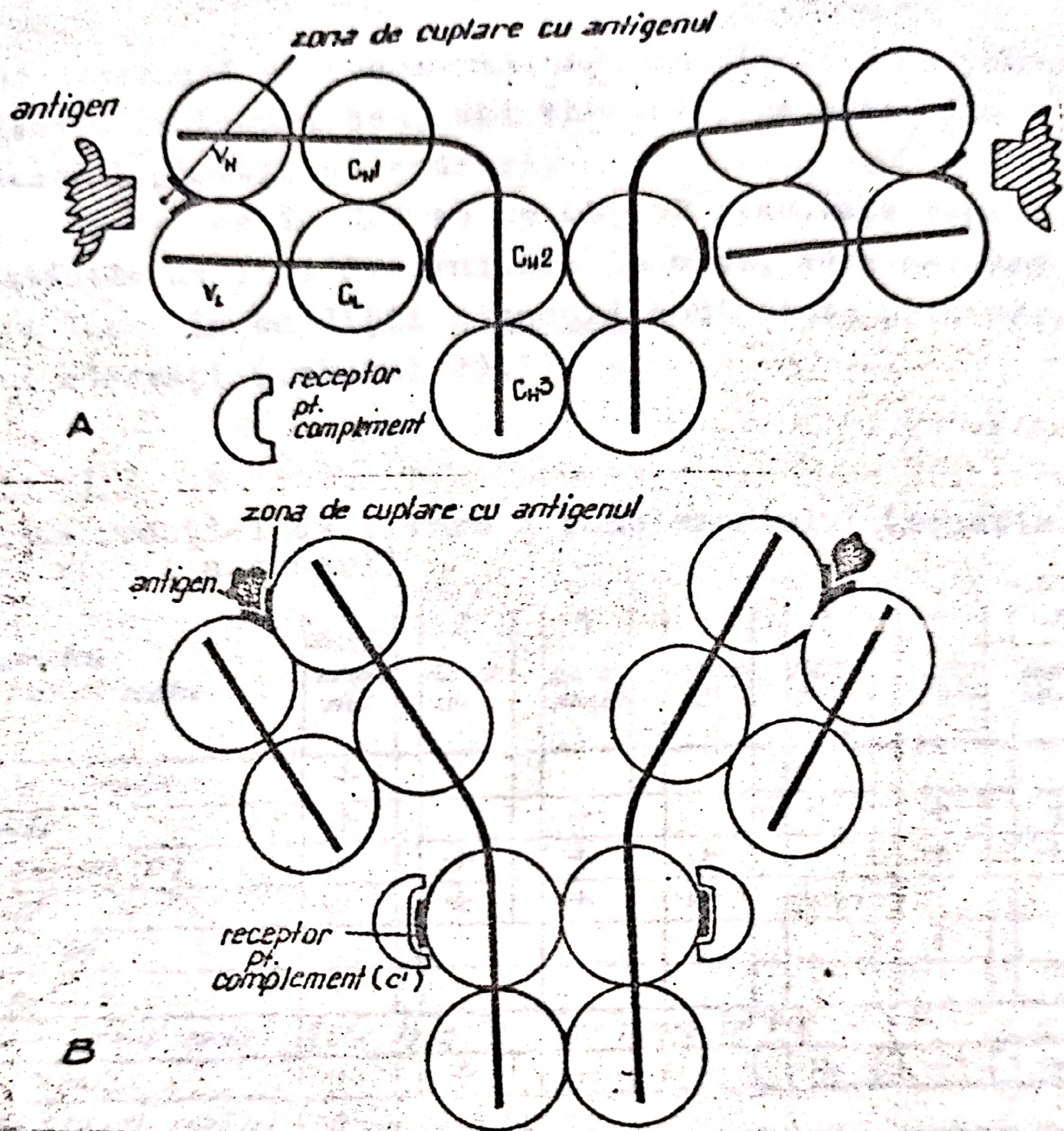


Fig.39 Reprezentare schematică a mecanismului fixării C' pe complexul antigen (Ag)-anticorp (Ac).
A) Ag şi Ac nu-şi corespund; complexul Ag-Ac nu se formează; receptorul pentru C' din zona HC_2 rămîne mascat; C' rămîne liber. B) Ag şi Ac îşi corespund; se formează complexul Ag-Ac. Prin cuplarea cu Ag, molecula Ac sufere o distorsiune prin care receptorul pentru C' este demascat; C' este fixat pe complexul Ag-Ac (după Edelman, 197o, modificat).

Testul este citit după o incubaţie de 3o min. la 37°C necesară desfăşurării reacţiei de hemoliză.

<u>Interpretare</u>:

Dacă antigenul şi anticorpul îşi corespund specific, în primul timp al reacţiei se formează complexul antigen-anticorp care fixează C'. In absenţa C' liber, în al doilea timp al reacţiei <u>nu apare hemoliza</u>: <u>reacţia este pozitivă</u>.

Dacă antigenul şi anticorpul nu-şi corespund specific, C' rămîne liber după primul timp al reacţiei, la dispoziţia sistemului indicator. Astfel, în al doilea timp al reacţiei <u>apare hemoliza</u>: <u>reacţia este negativă</u>.

Reacţia de fixare a complementului se vizualizează cu ajutorul cuplului hemolitic:

	Reacţie +	Reacţie -	
Ser de bolnav (anticorp)	+	-	Prima reacţie
Antigen microbian	+	+	
Complement	+	+	
Hematii de oaie	+	+	A doua reacţie
Ser hemolitic antioaie	+	+	
	Absenţă hemoliza	Hemoliză	

RFC permite şi obţinerea unor relaţii cantitative. In acest scop diluţii succesive de ser sînt testate faţă de o cantitate constantă, cunoscută de antigen în prezenţa unei cantităţi de C' de aseme-

nea constantă şi cunoscută. RFC cantitativă se poate efectua în tuburi sau, mai economic, pe plăci din material plastic cu godeuri.

Pentru ca în RFC să se obţină rezultate reproductibile de la o determinare la alta, este necesar a se lucra în condiţii standard controlate prin martori adecvaţi (tabelul 2).

Tabelul 2

Schema reacţiei de fixare a complementului (reacţia şi martorii necesari)

Legenda: + = 1 volum reactiv	1 Reacţia propriu zisă	2 Martor ser	3 Martor antigen	4 Martor C'	5 Martor cuplu hemol.	6 Martor pozitiv	7 Martor negativ
Ser de cercetat	+	+					
Antigen	+		+			+	+
Complement (C')	+	+	+	+		+	+
Diluent		+	+	+ +	+++		
Ser pozitiv						+	
Ser negativ							+
Incubare (prima reacţie)	1 oră la 37°C sau 18 ore la 4°C						
Cuplu hemolitic	+	+	+	+	+	+	+
Incubare (a doua reacţie)	30 min la 37°C						
Lectura reacţiei	Lipsa hemolizei	hemoliză	hemoliză	hemoliză	Lipsa hemolizei	Lipsa hemolizei	hemoliză

(1) - Reacţia propriu-zisă: antigen + ser de cercetat + C' + sistem hemolitic. Reacţie pozitivă = lipsa hemolizei; reacţie negativă = hemoliză.

2 - Martorul ser: ser de cercetat + C' + sistem hemolitic.

Pentru ca RFC să poată fi interpretată, martorul ser trebuie să prezinte liză. Lipsa hemolizei la martorul ser semnifică existența în serul de cercetat a unor substanțe anticomplementare, serul este anticomplementar. Fenomenul este frecvent întîlnit la serurile contaminate.

In cazul anticomplementarității, RFC se repetă pe o nouă probă de ser.

3 - Martorul antigen: antigen + C' + sistem hemolitic. Verifică activitatea anticomplementară a antigenului. Hemoliză = antigenul nu este anti-C'; lipsa hemolizei = antigenul este anti-C', nu este corespunzător.

4 - Martorul complement: C' + sistem hemolitic Verifică cantitatea de C' din reacție.

5 - Martorul pentru sistemul hemolitic: sistem hemolitic + diluent. Lipsa hemolizei = calitate corespunzătoare a hematiilor; hemoliză = calitate necorespunzătoare a hematiilor.

6 - Martorul pozitiv: ser pozitiv verificat în reacții anterioare + antigen + C' + sistem hemolitic = lipsa hemolizei. Titrul anticorpilor în serul pozitiv trebuie să se reproducă de la o reacție la alta.

7 - Martorul negativ: ser negativ verificat în reacţii anterioare + antigen + C' + sistem hemolitic = hemoliză.

RFC este larg aplicată în serodiagnosticul bacteriozelor (sifilisul în primul rînd, apoi al leptospirozelor, gonocociilor cronice, brucelozei), rickettsiozelor, virozelor, a unor infecţii fungice, cu protozoare sau a unor infestări cu helminţi.

(4) Decelarea anticorpilor la bolnav prin imuno-fluorescenţă

Se utilizează metoda indirectă (fig.4o B).

Un frotiu care conţine un antigen cunoscut (de exemplu, Treponema pallidum) este acoperit cu serul de cercetat. Se incubează. Se spală.

Se acoperă apoi cu o soluţie de anticorpi anti-gama globulină umană marcaţi fluorescent.

Dacă în ser există anticorpi faţă de antigenul din frotiu (în exemplul dat anticorpi anti-treponemici) aceştia, după primul timp al reacţiei rămîn fixaţi pe frotiu şi fixează la rîndul lor, în al doilea timp al reacţiei, anticorpii marcaţi anti-gama globulină umană, care fac complexul vizibil la microscopul cu fluorescenţă.

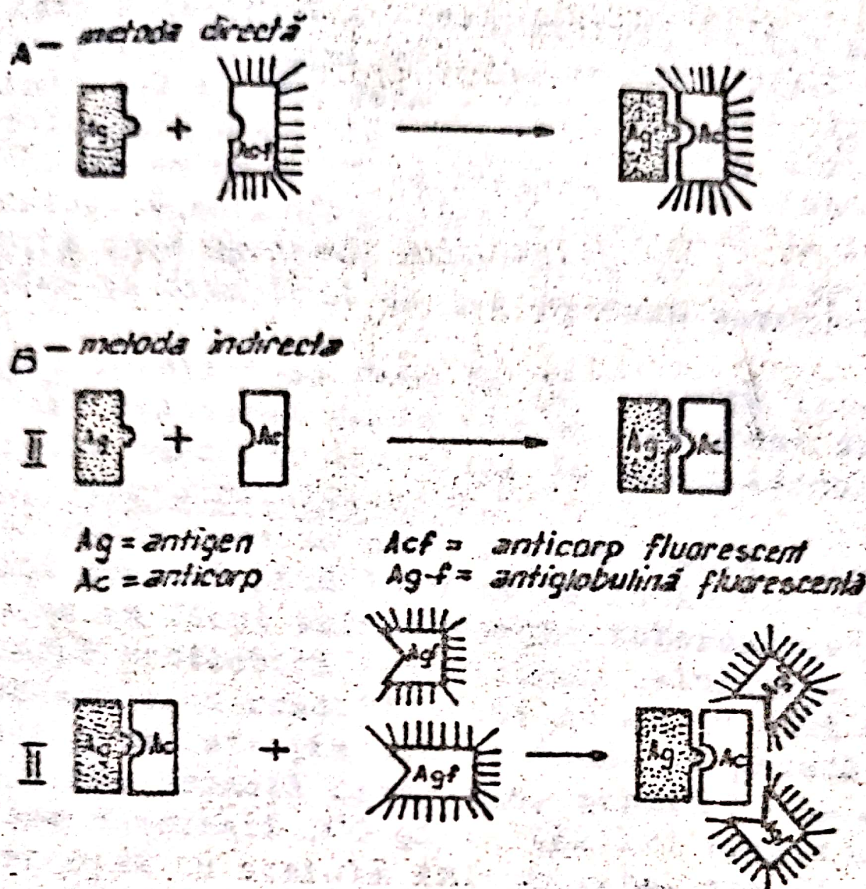


Fig.4c Principiul reacţiei de imunfluorescenţă

(5) Decelarea stărilor de sensibilizare prin teste intra-dermice

In unele infecţii cronice, atunci cînd examenul microbiologic a rămas negativ iar anticorpi umorali nu au putut fi decelaţi, cercetarea stării de sensibilizare poate aduce unele date utile pentru diagnostic. Cel mai frecvent este vorba de stări de sensibilizare de tip întîrziat, mediate de anticorpi celulari, care se evidenţiază prin inocu-

larea intra-dermică a unei mici cantități de antigen (culturi sau țesuturi infectate și inactivate, antigene purificate) - reacții intra-dermice (idr).

Starea de sensibilizare de tip întîrziat se dezvoltă după 4-8 săptămîni de evoluție a infecției și persistă, după vindecarea bolii sau chiar sterilizarea organismului, ani de zile sau toată viața. De aceea rezultatele acestor teste trebuie interpretate cu anumită atenție.

O reacție negativă la un antigen exclude cu siguranță infecția prin microbul corespunzător (cu condiția ca pacientul să nu fie în cursul sau după un tratament cu imuno-supresive sau într-o stare de anergie fiziologică - sarcină - sau patologică - rugeolă, gripă etc.) Surprinderea virajului de la negativ la pozitiv a reacției față de un antigen aduce cert dovada etiologiei infecției.

Cel mai frecvent este utilizată idr la tuberculină pentru triajul în vederea vaccinării BCG (acest triaj nu este necesar pentru vaccinarea BCG a nou-născuților) și a diagnosticării unor forme de tuberculoză.

In țara noastră se utilizează tuberculina purificată „PPD-IC 65" care este livrată în două doze:
- doza I conține 2 UT/o,1 ml (fiole marcate cu roșu),
- doza II conține lo UT/o,1 ml (fiole marcate cu albastru) și se utilizează numai pentru testarea persoanelor la care testul cu doza I a fost neconcludent.

Pe fața anterioară a antebrațului, în 1/3 mijlocie, după antiseptizarea tegumentului, se inoculează strict intra-dermic o,1 ml din doza I (2 UT/o,1 ml). În acest scop se folosește o seringă etanșă de 1 ml, divizată în loo, prevăzută cu ac de 1 cm lungime, fin, bine ascuțit și cu bizou scurt („seringă pentru tuberculină"). Injectarea este corectă dacă la locul inoculării se formează o bulă albă de edem cu diametrul de 5-6 mm care persistă cca lo min.

Citirea reacției se face la 72 ore după inoculare. Se înregistrează diametrul maxim (în mm) al zonei de congestie și infiltrație care s-a dezvoltat la locul inoculării.

Interpretarea rezultatelor:

- Persoanele care la doza I nu dau nici o reacție sau prezintă reacții pînă la 9 mm inclusiv urmează a fi vaccinate (nu au făcut primoinfecția tuberculoasă, nu posedă anticorpi protectori - anticorpi celulari).
- Persoanele cu reacții peste lo mm nu sînt vaccinate (au făcut primoinfecția tuberculoasă și posedă anticorpi protectori). Din această categorie, copiii (o-15 ani), care nu au fost vaccinați BCG și la testări anterioare nu au prezentat reacții cu această intensitate, vor fi supuși examenului radiologic pulmonar pentru depistarea eventualei infecții tuberculoase aparente.
- Persoanele cu reacții foarte intense după inocularea cu doza I (flictenă, ulcerație, necroză) - adulți sau copii - ca și persoanele la care s-a surprins un viraj brusc sau o intensificare a reacției sînt supuse investigațiilor radiologice și bacteriologice pentru depistarea tuberculozei.
- Dacă reacția rămîne negativă sau este sub 9 mm diametru și după testarea cu doza II, etiologia tuberculoasă a afecțiunii investigate poate fi exclusă.

Notă: retestarea cu doza II nu trebuie făcută la interval mai mare de 15 zile de la testarea cu doza I pentru a evita posibilitatea reacțiilor violente datorate infecției tuberculoase survenite într-un atare interval.

Ocazional se mai cercetează starea de sensibilizare de tip întîrziat prin idr la bruceliňă pentru diagnosticul brucelozei, la maleină pentru diagnosticul morvei, la tularină pentru diagnosticul tularemiei.

Se mai recurge la idr pentru diagnosticul unor viroze (idr Frei pentru diagnosticul limfogranulomatozei inghinale), unor micoze (coccidioidoză, histoplasmoză). Pentru diagnosticul hidatidozei, unde se dezvoltă atît o sensibilizare de tip imediat cît şi întîrziat la antigenul hidatic, se poate recurge la idr Casoni cu lichid hidatic.

(6) Teste de sensibilitate la toxine şi neutralizare intra-dermică

Inocularea intra-dermică a unor doze mici de toxină difterică sau de toxină eritrogenă streptococică la indivizi neimunizaţi determină reacţii locale. (congestie ş.a). Inocularea aceloraşi cantităţi de toxină la indivizi imuni nu este urmată de apariţia acestor reacţii locale.

(i) Idr Schick pentru depistarea receptivităţii la difterie.

Toxina Schick este toxină difterică diluată pentru a conţine 1/5o DLM pentru cobai/o,2 ml.

Pe faţa anterioară a antebraţului drept, în 1/3 mijlocie, după antiseptizarea tegumentului, se inoculează intra-dermic o,2 ml toxină. Ca martor, se inoculează, si-

milar, la antebrațul sting o,2 ml toxină inactivată 3o min. la 85°C.

Citirea reacției se face după 24-72 ore. Dacă este necesar se face o a doua citire după 5-7 zile.

a - Negativ: lipsa de reacție la ambele antebrațe.

b - Pozitiv: la nivelul testului, congestie care apare după 24-48 ore și crește pentru a atinge maximum între 4-7 zile. Lipsă de reacție la martor.

c - Negativ + pseudoreacție: congestie care apare după 24 ore și diminuă pentru a dispare complet pînă în ziua a 4-a la ambele antebrațe.

d - Pozitiv + pseudoreacție: congestie după 24 ore la ambele antebrațe. Dispare repede la nivelul martorului, rămîne la nivelul testului spre a evolua așa cum s-a arătat la (b).

Interpretarea rezultatelor:

Cei cu reacție negativă sînt imuni (au în circulație cel puțin 1/3o u antitoxice - suficient pentru a-i proteja de toxiinfecția difterică).

Cei cu reacție pozitivă sînt receptivi la difterie; trebuie vaccinați.

Cei negativi cu pseudoreacție sînt imuni și sensibilizați la antigene ale bacilului difteric.

Cei pozitivi cu pseudoreacție sînt receptivi la difterie și sensibilizați la antigene ale bacilului difteric; trebuie vaccinați dar cu doza fracționată.

(ii) Idr Dick pentru depistarea receptivității la scarlatină.

Toxina Dick este toxina eritrogenă a streptococului β-hemolitic grup A diluată pentru a conține 1 unitate reacțională cutanată (STD)/o,1 ml.

Pe fața anterioară a antebrațului drept, în 1/3 mijlocie, după antiseptizarea tegumentului, se inoculează intra-dermic o,1 ml toxină Dick. Ca martor, se inoculează, similar, la antebrațul sting o,1 ml toxină inactivată 2 ore la 100°C.

Citirea reacției se face după 24 ore.

a - Negativ: lipsă de reacție la ambele antebrațe.

b - Pozitiv: congestie și infiltrație cu diametrul

mai mare de 10 mm la nivelul testului. Lipsă de reacţie la martor.

c - Negativ + pseudoreacţie: congestie cu dimensiuni şi aspect identic la ambele antebraţe.

d - Pozitiv + pseudoreacţie: congestie mai intensă la nivelul testului decît la martor.

Interpretarea rezultatelor: cei cu reacţie negativă sînt imuni la scarlatină iar cei cu reacţie pozitivă sînt receptivi.

./.

PARTEA A PATRA

METODE DE LABORATOR IN CONDUCEREA ANTIBIOTERAPIEI

8 DETERMINAREA SENSIBILITATII BACTERIILOR LA ANTIBIOTICE (ANTIBIOGRAMA)

Sensibilitatea unei bacterii faţă de un antibiotic se testează i n v i t r o punînd-o în condiţii optime şi standardizate de cultivare (mediu de cultură, inoculum, timp de incubare etc.) în prezenţa unor cantităţi descrescînde ale antibioticului.

> Cea mai mică cantitate de antibiotic care inhibă dezvoltarea bacteriei testate se numeşte concentraţie minimă inhibitorie (CMI).
> CMI caracterizează relaţia microb-antibiotic i n v i t r o.

I n v i v o în relaţia microb-antibiotic intervine al treilea factor: organismul bolnav. Concentratiile de antibiotic activ care se realizează la nivelul focarului infectios sînt foarte diferite. Ele depind de (i) localizarea infecţiei, (ii) difuzibilitatea antibioticului în ţesuturi şi umori şi de (iii) procesele de inactivare pe care antibioticele le pot suferi în organism.

Pentru necesitățile terapeutice, relația microb-antibiotic *in vivo* este caracterizată de raportul dintre concentrația de antibiotic activ care poate fi atinsă în focarul infecțios și CMI a antibioticului. Acest raport este cunoscut sub numele de <u>nivel de eficiență inhibitorie</u> (NEI).

In mod curent, raportarea se face la nivelul seric mediu al antibioticului - așa cum poate fi obținut prin posologia uzuală a drogului. In limitele acestor parametri, microbul infectant se definește

<u>sensibil</u> dacă CMI este de minimum 2-4 ori mai mică decît nivelul seric mediu al antibioticului; efectul terapeutic se obține cu dozele uzuale de antibiotic;

<u>rezistent</u> dacă CMI este mai mare decît nivelul seric mediu; efectul terapeutic nu se poate obține: antibioticul își manifestă efectele toxice pentru organism înainte de a putea atinge CMI;

<u>moderat rezistent</u> dacă CMI este apropiată de nivelul seric mediu; efectul terapeutic se poate obține numai cu doze mari de antibiotic sau prin administrarea sa locală.

Se înțelege că pentru cazuri particulare, cum sînt de exemplu infecțiile urinare, meningiene, CMI a microbului izolat se va raporta la concentrația antibioticului activ în aceste umori.

După modalităţile tehnice de realizare a gradientului de concentraţii ale antibioticelor faţă de care se testează microbul de cercetat deosebim

1 - metoda diluţiilor şi
2 - metoda difuzimetrică

Indiferent de metoda la care se recurge, testarea sensibilităţii la antibiotice a tulpinii de cercetat trebuie făcută în paralel cu cea a unei tulpini martor. Numai în acest mod se poate controla reproductibilitatea rezultatelor. Ca tulpini martor se folosesc tulpini de colecţie, care şi-au păstrat nealterat spectrul natural de sensibilitate la antibiotice, de exemplu:

- tulpina Oxford de Staphylococcus aureus (NCTC 6571) în cazul testării bacteriilor gram-pozitiv şi
- Escherichia coli (NCTC lo.418) în cazul testării bacililor gram-negativ.

(1) Determinarea CMI prin metoda diluţiilor de antibiotic în tuburi

In 2 şiruri de tuburi se fac diluţii duble ale antibioticului într-un mediu de cultură care permite cultivarea optimă a bacteriei testate fără a interfera cu activitatea antibiotică (mediul Mueller-Hinton, de exemplu). Diluţiile trebuie să meargă de la cea mai mare concentraţie a antibioticului posibil de obţinut în sînge pînă la o concentraţie in-

ferioară CMI a tulpinii martor. In cazul în care se testează tulpini izolate din lcr sau urină scara diluţiilor se adaptează concentraţiilor de antibiotic posibil de obţinut în aceste umori.

Fiecare tub din primul şir este însămînţat cu o cantitate constantă din cultura de 24 ore a bacteriei de testat (suspensie a culturii standardizată nefelometric).

Similar, fiecare tub din şirul al doilea este însămînţat cu cultura tulpinii martor.

Obligator, testul trebuie însoţit de

- un martor pentru sterilitatea mediului (mediu neînsămînţat) şi
- martori pentru cultivare (mediu fără antibiotic însămînţat cu tulpinile testată şi martor).

Tuburile sînt incubate la 37°C pînă în momentul în care opacitatea tuburilor martor pentru cultivare atestă apariţia culturii (uzual peste noapte).

CMI a antibioticului pentru tulpina testată este dată de concentraţia de antibiotic din ultimul tub fără creştere evidentă (fig.41).

CMI a tulpinii martor trebuie să se reproducă (+ sau - o diluţie) de la o determinare la alta.

Dacă se efectuează numărătoarea germenilor viabili din tuburile fără cultivare evidentă, poate fi determinată concentratia minimă bactericidă (CMB), definită ca cea mai mică concentraţie de antibiotic care distruge în proporţie de 99,9-100% bacteriile

din inoculum iniţial.

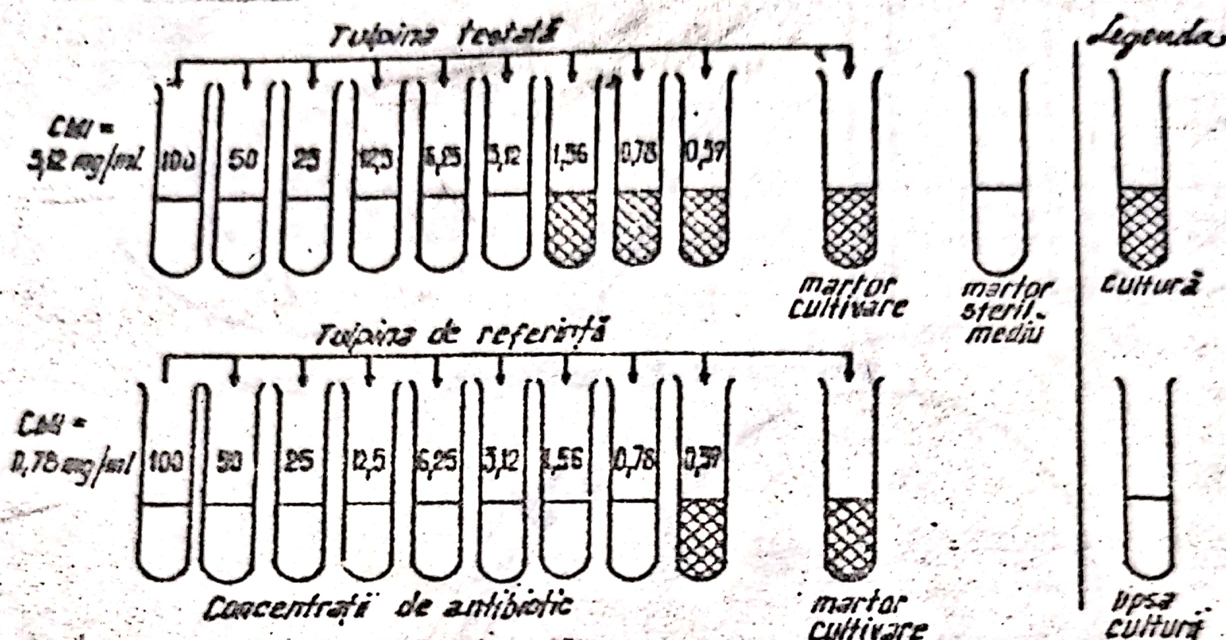


Fig.41 Determinarea CMI de antibiotic prin metoda diluţiilor

(2) In metoda difuzimetrică gradientul de concentraţii necesar se realizează în mediu solid prin difuzarea antibioticului dintr-un depozit depus pe suprafaţa mediului într-o placă Petri după însămînţarea microbului de testat. Acest gradient scade proporţional cu distanţa de la depozit. Cultura nu apare în aria în care antibioticul depăşeşte sau a atins CMI pentru microbul testat. Cu cît CMI este mai redusă cu atît aria de inhibiţie apare mai mare şi invers (fig.42).

Se folosesc rondele de hîrtie de filtru sau

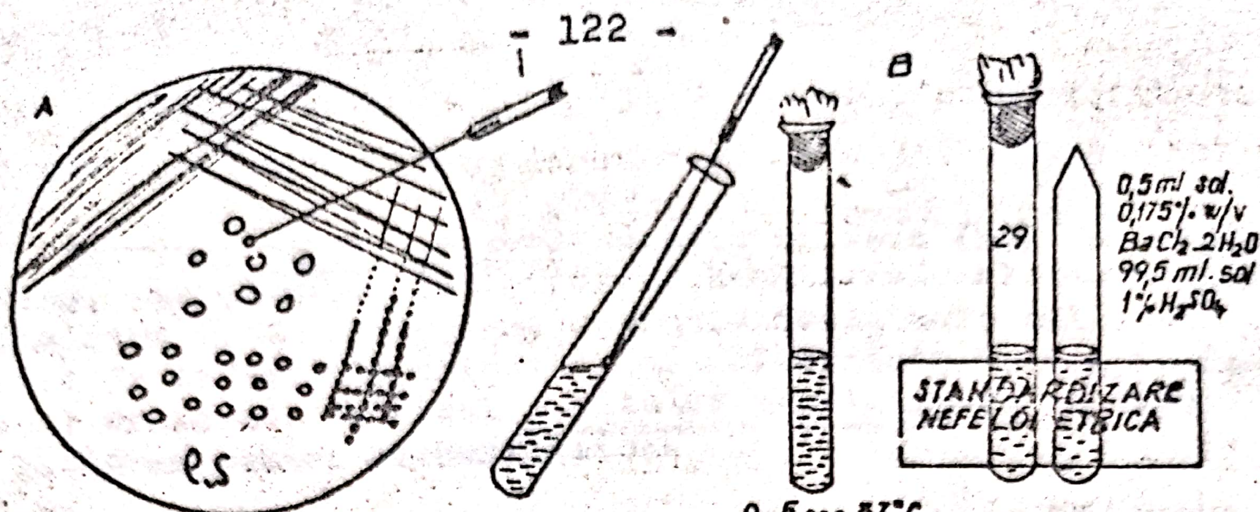
microcomprimate*) din care difuziunea antibioticului se face radiar. Pentru a recunoaşte antibioticele, rondelele sau microcomprimatele sînt colorate diferit sau/şi poartă iniţiala antibioticului conţinut. Cantitatea de antibiotic conţinută/rondelă sau în microcomprimat este de ordinul de mărime al concentraţiilor posibil de obţinut în organism în condiţii terapeutice.

Prezentăm metoda difuzimetrică recomandată de Comitetul de Bacteriologie al Asociaţiei de Patologie Clinică din Marea Britanie şi de prof.Balş în ţara noastră.

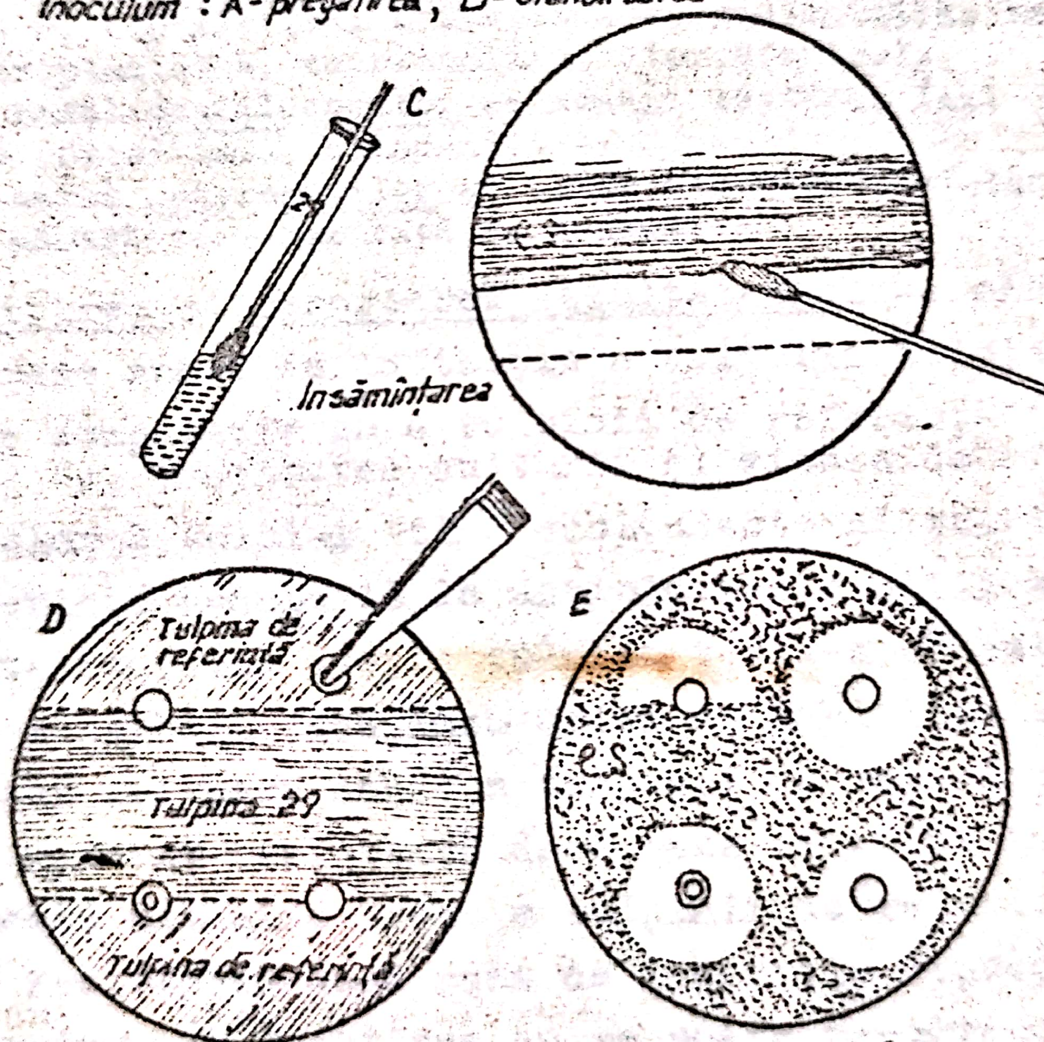
Intr-o placă Petri cu diametrul de lo cm şi cu fundul perfect plan se toarnă mediul de cultură, care trebuie să satisfacă necesităţile nutritive ale microbilor testaţi, să permită o bună difuziune a antibioticelor şi să nu interfereze cu acţiunea lor (recomandăm mediul Mueller-Hinton).

Cu ajutorul unui tampon se însămînţează uniform,cu bacteria testată,1/3 mijlocie a plăcii. Tulpina de referinţă este însămînţată în mod similar în 1/3 superioară şi inferioară (fig.42 c).

*) La noi în ţară, trusele cu microcomprimate pentru antibiograme sînt livrate de Institutul pentru Controlul de Stat al Medicamentului. Se livrează truse de uz curent şi truse pentru infecţii stafilococice (concentraţia de antibiotic/microcomprimat raportată la nivelul seric al antibioticului), truse pentru infecţii urinare (incluzînd microcomprimate în care concentraţia de antibiotic este raportată la concentraţia urinară), truse pentru infecţii locale.



Inoculum : A - pregătirea, B - standirzarea



D- Depunerea rondelelor
Legenda P= penicilină
E= eritromicină
O= oxacilina
T= tetraciclina

E citirea zonelor de inhibiție
Tulpina 29 P = rezistent
E = sensibil
O = sensibil
T = moderat rezistent

Fig.42 Antibiograma difuzimetrică (schematic).

Inoculum trebuie să asigure o cultură cu colonii semiconfluente şi trebuie să aibă aceeaşi densitate de la o determinare la alta. Pentru acest motiv se folosesc suspensii bacteriene standardizate.

Inoculum poate fi reprezentat de cultură tînără (18-24 ore) a bacteriei testate izolată în prealabil în cultură pură (fig.42 A), de unde numele de antibiogramă pe cultură secundară (ACS). In ACS standardizarea inoculum-ului se face nefelometric (fig.42 B).

In cazul produselor patologice monomicrobiene (lcr, exsudate din cavităţile seroaselor, puroi din colecţii închise ş.a.), cu o densitate suficientă a bacteriei infectante (apreciată microscopic), pentru antibiograma difuzimetrică se poate folosi ca inoculum însuşi produsul patologic - antibiograma se face concomitent cu izolarea bacteriei infectante, de unde şi numele de antibiogramă pe cultură primară (ACP). In cazul ACP standardizarea inoculum-ului (microscopică) rămîne aproximativă, dar este suficientă pentru necesităţile clinice curente.

Rondelele sau microcomprimate cu antibiotic sînt depuse pe interliniile care separă suprafeţele însămînţate cu tulpina test şi cea de referinţă (fig.42 D).

După depunerea microcomprimatelor, plăcile sînt incubate cu capacul în jos la 37°C timp de 18-

24 ore.

Testarea <u>bacililor gram-negativ</u> se face faţă de: ampicilină, cephalotină, gentamicină, kanamicină, streptomicină polimixină B, tetraciclină, cloramfenicol, acid nalidixic (numai în infecţiile urinare), nitrofurantoin (numai în infecţii urinare). In cazul <u>bacilului piocianic</u> se va face şi testarea pentru carbenicilina.

Testarea <u>bacteriilor gram-pozitiv</u> se face faţă de: penicilină G, cephalotină, eritromicină, gentamicină, kanamicină, streptomicină, tetraciclină, cloramfenicol.

In cazul <u>stafilococilor</u> se adaugă testarea faţă de meticilină (oxacilină), clindamicină.

In cazul <u>enterococilor</u> şi altor streptococi α-hemolitici se adaugă testarea faţă de ampicilină.

<u>Citirea şi raportarea rezultatelor</u>. Se măsoară în mm raza zonei de inhibiţie a culturii tulpinii testate comparativ cu a tulpinii de referinţă*) (fig.42 E). Densitatea culturii şi viteza de creştere a celor 2 tulpini fiind echivalente şi tulpina de referinţă sensibilă la antibioticele utilizate, se poate conchide despre tulpina testată că este

- sensibilă dacă raza ariei de inhibiţie este egală sau mai mare decît a tulpinii de referinţă;
- moderat rezistentă dacă raza ariei de inhibiţie este mai mică decît a tulpinii de referinţă;
- rezistentă dacă zona de inhibiţie lipseşte.

Aşadar, în acest caz nu se poate raporta o valoare definită a CMI pentru tulpina testată ci <u>se apreciază dacă aceasta este sau nu de acelaşi ordin</u>

*) Diferenţele de ± 2 mm nu sînt semnificative.

de mărime cu a tulpinii martor care este sensibilă la antibioticul respectiv.

Există şi alte metode standardizate pentru efectuarea antibiogramei difuzimetrice, cum este, de exemplu, metoda Kirby-Bauer în care testarea tulpinii cercetate şi a celei de referinţă se fac pe plăci separate. In acest caz se apreciază diametrele zonelor de inhibiţie care sînt raportate la tabele standard. In aceste tabele este indicat diametrul zonelor de inhibiţie pentru tulpinile sensibile, moderat rezistente şi rezistente în funcţie de antibiotice şi de categoria bacteriei testate (stafilococi, enterococi, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* ş.a.). Cei interesaţi asupra amănuntelor privind această metodă pot consulta cu folos bibliografia indicată.

Observaţii privind rezultatele metodei diluţiilor în tub şi a celei difuzimetrice. Indicaţiile celor 2 categorii de metode.

Metoda diluţiilor în tub dă informaţii precise privind CMI a antibioticului. Este însă laborioasă şi costisitoare. Indicaţiile acestei metode sînt:

(i) antibiograma tulpinilor izolate în hemoculturi;

(ii) antibiograma tulpinilor izolate de la pacienţi care nu răspund la o antibioterapie aparent adecvată (fie că nu răspund de la început, fie că fac recăderi).

Metoda difuzimetrică dă informaţii privind numai ordinul de mărime al CMI. Nu poate fi aplicată pentru bacteriile cu creştere lentă (*Mycobacterium*

tuberculosis ş.a.) (i) In schimb este o metodă facilă care permite testarea economică, concomitent față de mai multe antibiotice, a bacteriilor cu creştere rapidă. (ii) Permite efectuarea ACP. De aceea este metoda practicii de rutină.

In general, terapia antimicrobiană se face cu un singur antibiotic. Pentru conducerea tratamentului antimicrobian în circumstanțe care impun administrarea unei asociații de antibiotice (infecții mixte determinate de bacterii cu pattern diferit de sensibilitate, tratamente prelungite în care apare pericolul instalării rezistenței dobîndite, endocardite subacute cauzate de bacterii rezistente la penicilină ş.a.), clinicianul se poate adresa laboratorului de microbiologie pentru testarea efectului antimicrobian al unor asociații de antibiotice (efect aditiv, sinergic sau antagonist, efect bactericid sau numai bacteriostatic). In acest scop laboratorul poate recurge la metoda diluțiilor în tub sau la metoda difuzimetrică. Cei interesați asupra amănuntelor tehnice pot consulta bibliografia indicată din care recomandăm în special pe Stokes (1968) şi Buttiaux şi colab. (1969).

./.

9 CERCETAREA ANTIBIOTICELOR ÎN UMORI ÎN CURSUL ANTIBIOTERAPIEI

(1) Cercetarea antibioticelor în ser se face

- în infecţii bacteriene severe: endocardite subacute, septicemii;
- după administrarea unui antibiotic nou sau pe o cale nouă;
- în cursul antibioterapiei (exceptînd penicilina) la pacienţi cu deficienţe funcţionale renale (pericolul supradozării).

Determinarea concentraţiei unui antibiotic în ser. Stabilirea nivelului de eficienţă inhibitorie (NEI) sau bactericidă (NEB) a serului în cursul antibioterapiei.

Pentru determinările în ser, ca şi în celelalte umori sterile, se recurge la metoda diluţiilor în mediu lichid.

Probele de sînge se recoltează steril şi sînt imediat expediate la laborator unde este separat serul.

Inainte de începerea antibioterapiei se recoltează o probă care serveşte ca martor. După 24 ore de antibioterapie, timp necesar pentru stabilizarea ratei de absorbţie şi excreţie a antibioticului, se recoltează probe pentru determinarea propriuzisă.

Dacă administrarea antibioticului se face discontinuu, recolta se face în momentul în care curba concentraţiei serice atinge minimum (imediat înaintea administrării următoarei doze de antibiotic).

Intr-un şir de tuburi se fac diluţii duble ale serului în mediu Mueller-Hinton (uzual de la 1:2 la 1:128; pentru germenii foarte sensibili, cum este Streptococcus pyogenes, diluţiile pot să meargă pînă la 1:2o48). Intr-un al doilea şir de tuburi se efectuează, în acelaşi mediu de cultură, diluţii duble ale antibioticului administrat. Diluţiile de antibiotic vor acoperi o gamă de concentraţii estimate ca posibil prezente în ser. Pentru a elimina eventualele interferenţe între antibiotic şi proteinele serice, pH etc. soluţia mamă se face în proba de ser recoltată înaintea administrării antibioticului sau, în lipsă, în ser uman normal.

Toate tuburile sînt însămînţate cu tulpina izolată de la bolnav - inoculum standardizat: o,o5 ml din diluţia 1/1ooo a culturii de 6 ore în bulion în cazul bacteriilor cu creştere rapidă sau o ansă din cultura de 24 ore în bulion în cazul celor cu creştere lentă.

Pentru o determinare corectă, următorii martori sînt obligatorii:

- martor pentru efectul antibacterian al umorii propriuzise: se însămînţează cu o tulpină verificată ca rezistentă la antibioticul testat cîte un tub din

cea mai mică diluţie a serului şi antibioticului;

- martor pentru sterilitatea serului;
- martor pentru sterilitatea mediului de cultură şi a soluţiei de antibiotic;
- martor pentru cultivarea tulpinii bacteriene test.

Toate tuburile se incubează peste noapte la 37°C

Citirea şi raportarea rezultatelor

Citirea rezultatelor se poate face din momentul în care martorul pentru cultivarea bacteriană indică apariţia culturii. Se identifică în ambele şiruri ultimul tub fără creştere evidentă•). Aici este realizată CMI a antibioticului. Din al doilea şir de tuburi aflăm valoarea CMI. Din primul, aflăm diluţia de ser în care s-a realizat CMI. Produsul dintre CMI şi inversul diluţiei de ser în care aceasta s-a realizat ne dă concentraţia de antibiotic activ în ser (C).

In exemplul din fig.43 ultimile tuburi fără creştere evidentă sînt:

- tubul 5 din şirul 2, deci CMI a kanamicinei faţă de bacteria infectantă este 3 mcg/ml;
- tubul 3 din şirul 1, deci CMI s-a realizat în diluţia 1:8 a serului, deci în serul nediluat

•) Unele probe de ser fiind opalescente este precaut a se face pasaje din fiecare tub pe cîte un sector al unei plăci cu mediu de cultură.

sînt 3x8=24 mcg kanamicină/ml.

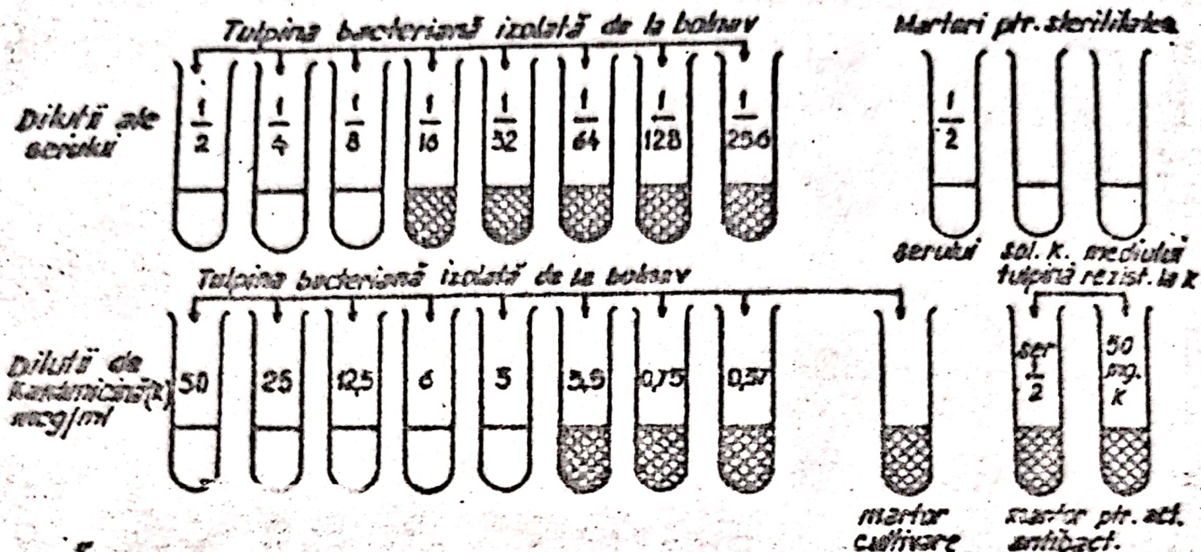


Fig.43 Schema determinării NEI concomitent cu dozarea kanamicinei în serul sanguin

Si acum să examinăm următoarele relaţii - valabile <u>numai</u> pentru determinările efectuate cu tulpina infectantă.

$$(1)\ NEI = \frac{C}{CMI}\ ; \qquad (2)\ C = CMI \times \text{inversul diluţiei de ser în care s-a realizat}$$

$$\text{deci (3) } NEI = \frac{CMI \times \text{inversul diluţiei}}{CMI} = \text{inversul diluţiei}$$

deci, în exemplul nostru, NEI = 8.

Dacă în diluţiile de ser fără creştere evidentă se face numărătoarea germenilor viabili, se poate determina şi <u>nivelul de eficienţă bactericidă</u>. (NEB) a serului (diluţia maximă de ser care distruge bacteriile din <u>inoculum</u> în proporţie de 99,9-100%)

Cu alte cuvinte, pentru determinarea NEI s... NEB în practica de rutină se poate opera numai ... şirul de tuburi cu diluţii ale serului de testa... însămînţate cu tulpina infectantă.

Dacă nu dispunem de tulpina infectantă put... face numai determinarea concentraţiei de antibiotic activ în ser utilizînd în acest scop o tulpină de referinţă.

Cercetarea antibioticelor prin metoda diluţiilor în tub (cu specificaţiile de mai sus) este aplicabilă pentru oricare alta din umorile normal sterile ale organismului (lcr, exsudate din cavităţile seroaselor ş.a.). Pentru determinări în umorile normal contaminate (urina recoltată în cursul micţiunii spontane, spută ş.a.) sînt indicate metode difuzimetrice.

(2) Cercetarea antibioticelor în lcr se face în cursul antibioterapiei bolnavilor cu meningite purulente sau cu meningită tuberculoasă.

(3) Cercetarea antibioticelor în urină se face la bolnavii cu infecţii urinare

- prezentînd deficienţe funcţionale renale;
- după administrarea unui antibiotic nou sau pe o cale nouă.

PARTEA A CINCEA

IDENTIFICAREA PRINCIPALELOR BACTERII IMPLICATE IN PATOLOGIA INFECTIOASA

Nu încercați să rețineți datele prezentate în tabele. In practica identificării bacteriilor, reacțiile metabolice sînt selectate și interpretate cu tabelele în față.

IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-POZITIV AŞEZAŢI IN GRĂMEZI

Staphylococcus

Micrococcus

Peptococcus

Dintre cocii gram-pozitiv aşezaţi în grămezi îi reţinem, cu interes pentru patologia infecţioasă, pe cei aerobi reuniţi în genurile Staphylococcus şi Micrococcus (familia Micrococcaceae) şi pe cei anaerobi reuniţi în genul Peptococcus (familia Peptococcaceae).

Stafilococii sînt cei care se izolează cel mai frecvent din infecţii.

Genul Staphylococcus

Saprofiţi oportunişti, găzduiţi normal pe tegumente şi mucoase, stafilococii contaminează frecvent produse patologice ca exsudatul faringian, sputa, materiile fecale, urina. S.epidermidis contaminează uneori şi hemoculturile.

S.aureus îl urmărim şi trebuie să-l identificăm în produse patologice ale infecţiilor pe care le determină: puroiul supuraţiilor cu variate localizări

(plăgi traumatice şi post-operatorii, piodermite, abcese, osteomielite), sînge (hemoculturi) în septicemii, lcr în meningite, sputa în pneumonii, urina în infecţiile căilor urinare, materiile fecale în enterocolitele post-antibiotice, materiile fecale, vărsături şi alimente în toxiinfecţiile alimentare.

S.epidermidis, bacterie cu potenţial foarte redus de patogenitate, determină infecţii numai atunci cînd capătă acces şi se grefează în zone ale organismului cu apărare antiinfecţioasă precară (depozite de fibrină de pe valvulele cardiace, căile urinare în cursul uropatiilor obstructive ş.a.) Este izolat în mod repetat în hemoculturi practicate la bolnavi cu endocardite după cateterisme vasculare şi intervenţii chirurgicale pe cord, la bolnavi cu shunt ventriculo-venos pentru controlul hidrocefaliei, din urină în infecţii ale căilor urinare.

In spitale se cercetează prezenţa tulpinilor epidemigene de S.aureus în exsudatul nasal şi faringian la personal, în diferite probe de mediu (aer, suprafeţe ş.a.) şi în produse patologice de la bolnavi.

Rezervorul natural al S.aureus este mucoasa nazală.

Frotiul Gram din produse patologice evidenţiază coci sferici gram-pozitiv aşezaţi în perechi şi, ca-

racteristic, în grămezi neregulate. Cocii morţi nu reţin colorantul violet şi apar gram variabil, cei gram-negativ putînd fi confundaţi cu Neisseria. Sînt dispuşi intra sau extracelular (fig.44).



Fig.44 Stafilococi. Frotiu: A - din produs patologic, B - din cultură (schematic)

Morfo-tinctorial, între stafilococi nu pot fi făcute diferenţieri.

Cultura se dezvoltă după 18-24 ore de incubare aerobă sau anaerobă la 37°C, chiar şi pe mediile de bază - bulion şi geloză nutritivă.

Pe geloză sînge, după incubare aerobă peste noapte, dezvoltă colonii rotunde cu diametrul de 1-2 mm, bombate, lucioase, opace.

Pigmentogeneza este variabilă şi la culturile tinere discretă; se accentuează dacă cultura este lăsată pe masa de lucru pînă a doua zi.

Tulpinile care elaborează hemolizine formează colonii β-hemolitice (colonii înconjurate cu o zonă largă de hemoliză clară, completă).

Majoritatea tulpinilor de S.aureus formează colonii -hemolitice pigmentate frecvent în galben-auriu.

S.epidermidis formează colonii albe nehemolitice.

Sinteza echipamentului de patogenitate al S.aureus (antigene de suprafaţă, hemolizine, hialuronidază, dezoxiribonuclează, coagulază, fibrinolizină, enterotoxină ş.a.) prezintă largi variaţii care se reflectă direct în potenţialul de patogenitate al diferitelor tulpini. Cel mai constant asociată cu patogenitatea S.aureus este coagulaza. S.epidermidis este coagulazo-negativ.

Evidenţierea coagulazei prin testul în tub: o,5 ml plasmă citratată de iepure (2 ml sol.5% citrat de Na + 8 ml sînge) diluată 1/4 cu ser fiziologic într-un tub de loxloo mm este bogat însămînţată cu o ansă din cultura de 24 ore pe geloza a tulpinii de testat. Tubul este lasat pe baia de apă la 37°C. Se urmăreşte coagularea plasmei în intervalul de 1-4 ore.

Pentru identificarea tulpinilor producătoare de enterotoxină singurul test accesibil rămîne inocularea intra-peritoneală a 1-3 ml din filtratul toxic (aliment, vărsături, cultură) la pisoi de 6-8 săptă-

mîni.

Tiparea fagică, aplicabilă numai la tulpinile coagulazo-pozitive, este utilă pentru identificarea tulpinilor epidemigene, de spital ale S. aureus. Nu are valoare diagnostică la bolnav. Tulpinile izolate dintr-o izbucnire epidemică de spital aparţin aceluiaşi tip fagic.

Antibiograma. Stafilococii sînt natural sensibili la toate antibioticele active asupra bacteriilor gram-pozitiv. Dar tulpinile de stafilococ dobîndesc surprinzător de repede rezistenţă la antibiotice, atît la cele cu largă utilizare cît şi la cele nou introduse în uz. De aceea, antibiograma se impune pentru toate tulpinile de stafilococ izolate de la bolnav şi demonstrate a fi tulpini infectante.

In concluzie

Identificarea stafilococilor se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale şi de cultură. Cercetarea coagulazei este cel mai important test de rutină pentru aprecierea potenţialului de patogenitate al unei tulpini de stafilococ. Antibiograma este indispensabilă pentru antibioterapia infecţiilor stafilococice.

Specii de Micrococcus sînt rar implicate în infecţii Totuşi, ca saprofiţi frecvenţi pe tegumente, pot contamina unele produse patologice.

Morfo-tinctorial se diferenţiază greu de stafilococi deşi sînt coci cu diametrul în general mai mare. Se individualizează prin testul de oxidare-fermentare: micrococii oxidează glucoza în timp ce stafilococii o fermentează.

Peptococii sau stafilococii anaerobi, saprofiţi oportunişti ai căilor respiratorii superioare şi ai căilor genitale, sînt uneori izolaţi din infecţii - de obicei mixte - genitale, pulmonare şi alte supuraţii. Morfologic nu se deosebesc de stafilococi dar sînt obligat anaerobi.

./.

11 IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-POZITIV AȘEZ[ATI] IN LANTURI

Streptococcus pyogenes

Streptococi piogeni animali

Streptococcus pneumoniae

Enterococi

Streptococi viridans

Cocii gram-pozitivi așezați în lanțuri sînt reuniți în familia Streptococcaceae, care cuprinde streptococii aerobi facultativ anaerobi, și în genul Peptostreptococcus (al familiei Peptococcaceae), care cuprinde streptococii anaerobi.

Majoritatea streptococilor sînt saprofiți nepatogeni sau comensali oportuniști. Cîteva specii sînt patogene pentru om și animale (tabelul 3).

Streptococii piogeni

Streptococii piogeni sînt bacterii patogene. Cei care determină în mod natural infecții ale omului sînt reuniți în specia Streptococcus pyogenes. Speciile patogene pentru animale, numite uzual streptococi piogeni animali, pot determina accidental infecții ale omului.

S.pyogenes îl urmărim și trebuie să-l identificăm în produsele patologice ale infecțiilor pe

care le determină: exsudatul faringian în angine şi scarlatine, puroi şi exsudate în infecţii epidemice ale plăgilor, piodermite, celulite, flegmoane ş.a., lohii în infecţiile puerperale, sînge (hemoculturi) în septicemii ş.a.

In scop epidemiologic, S.pyogenes se cercetează în exsudatul faringian şi nazal pentru depistarea purtătorilor sănătoşi din colectivităţi.

Streptococcus pneumoniae

Pneumococii nevirulenţi (forma R) sînt frecvent găzduiţi la nivelul mucoaselor bucală şi faringiană normale. Prezenţa şi numărul lor suferă variaţii sezoniere şi anuale. Contaminează normal probele de exsudat faringian şi de spută.

Tulpinile virulente de pneumococ sînt urmărite şi trebuie identificate în produsele patologice ale infecţiilor pe care le determină: sputa în pneumonii, lcr în meningite, puroiul în otite, mastoidite, peritonite, ocazional plăgi, infecţii oculare. Se urmăreşte, de asemenea, în hemoculturile practicate pentru depistarea bacteriemiilor care însoţesc pneumoniile şi alte infecţii localizate.

Streptococii comensali oportunişti

Enterococii habitează intestinul omului şi al animalelor. Apar în calitate de contaminanţi nor-

Tabelul 3.

Tipul de hemoliză, habitatul şi patogenitatea pentru om a streptococilor

Grupări fiziologice	Grupul serologic	Specia	Tipul hemolitic*)	Habitat	Patogenitatea pentru om
		Streptococcus			
Streptococii piogeni	A	S.pyogenes	β	om	Numeroase infecţii la om
	B	S.agalactiae	α/β	bovidee	Izolaţi uneori şi din infecţii umane
	C	Diferite specii	α/β	bovidee, cabaline, ovine ş.a.	
		Tulpini umane	β	om	Infecţii resp.
	E		β	bovidee	Izolat uneori din inf. umane
	F	S.anginosus	β	om	Posibilă (inf. respiratorii)
	G		β	om	Infecţii la om uneori grave
	H	S.sanguis	α	om	Posibilă (inf. respiratorii, endocardite)
Pneumococi		S.pneumoniae	α	cavitatea buco-faringiană la om şi animale	Comensal, oportunist (inf. respiratorii, otite, meningite peritonite ş.a.)
Enterococi	D	Diferite specii	α/β/-	intestinul omului şi animalelor	Comensali, oportunişti (inf.urinare, endocardite subacute)
Streptococi viridans		Diferite specii	α	cavitatea buco-faringiană la om şi animale	Comensali, accidental patogeni (endocardite subacute)
Streptococi lactici	N	S.lactis S.cremoris	- -	lapte şi produse lactate	Nepatogeni
		Peptostreptococcus			
Streptococi anaerobi		Diferite specii	-	mucoasa genitală	Comensali, oportunişti (febră puerperală, endocardite, inf.mixte plăgi)

mali ai materiilor fecale, urinii din micţiunea spontană. In afara oricărei condiţii patologice, pot fi prezenţi, ocazinal, în exsudatul faringian.

Ii urmărim şi trebuie să-i identificăm în produsele patologice ale infecţiilor pe care pot să le determine: sînge (hemoculturi) în endocarditele subacute, urina în infecţiile căilor urinare, exsudate din infecţiile genitale.

Streptococii viridans sînt cei mai constanţi şi numeroşi comensali ai cavităţii bucale şi faringiene normale. In mod accidental, la bolnavi cu leziuni valvulare cardiace determină endocardite subacute putînd fi evidenţiaţi prin hemoculturi.

Streptococii anaerobi.habitează natural mucoasa căilor genitale fiind găsiţi în mod normal în secreţiile vaginale. Au fost izolaţi din lohii în infecţii uterine post-partum, din puroiul unor supuraţii pleuro-pulmonare, abcese cerebrale, hepatice, plăgi profunde supurate, din sînge (hemoculturi) de la bolnavi cu endocardită subacută.

Frotiul Gram din produse patologice evidenţiază coci gram-pozitivi aşezaţi în lanţuri de lungime variată sau în perechi. Cocii sînt sferici sau eliptici cu axul lung în prelungire.(fig.45).

Pneumococii virulenţi, în produsele patologice din infecţiile pe care le determină, apar caracteristic ca diplococi lanceolaţi, gram-pozitivi,

capsulaţi (fig.46 A).

Exceptînd pneumococii virulenţi, morfo-tinctorial, între speciile de streptococi nu pot fi făcute diferenţieri, indiferent de caracterul lor - saprofit, comensal sau patogen, aerob sau anaerob.

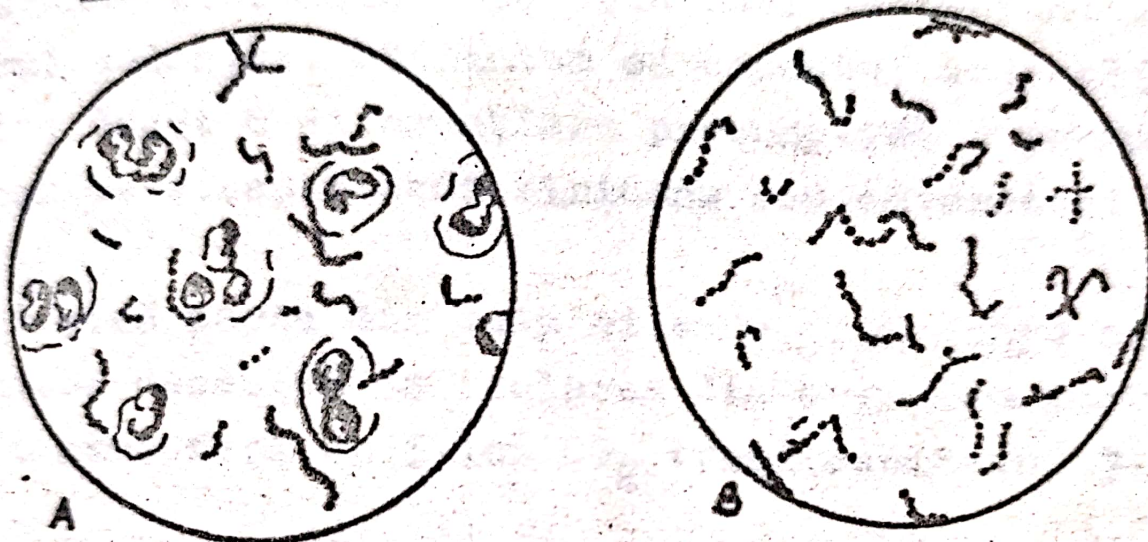


Fig.45 Streptococi. Frotiu: A - din produs patologic, B - din cultură (schematic)

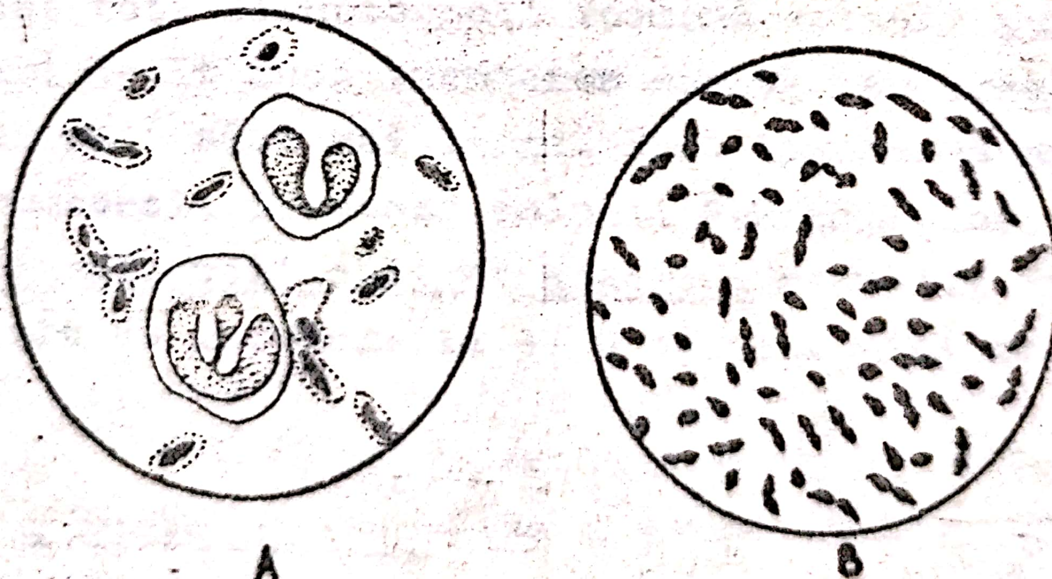


Fig.46 Pneumococul. Frotiu: A - din produs patologic, B - din cultură (schematic)

Cultivaţi i n v i t r o pierd capsula şi tind să se dispună în lanţuri.

Morfotinctorial, între pneumococii nevirulenţi şi streptococii comensali, care contaminează şi ei normal probele de spută ş.a. nu pot fi făcute diferenţieri.

Cultura se dezvoltă după 18-24 ore de incubaţie la 37°C. Majoritatea speciilor necesită medii îmbogăţite în factori nutritivi.

(i) Pe geloză sînge după incubare aerobă dezvoltă colonii mici de o,1-1 mm diametru cu aspect variabil după specie şi tulpină.

- Coloniile β-hemolitice sînt înconjurate cu o zonă largă de hemoliză completă, clară. Colonii β-hemolitice formează majoritatea tulpinilor de S.pyogenes, unii streptococi piogeni animali, unii enterococi şi, rar, unii pneumococi.

- Coloniile α-hemolitice sînt înconjurate cu un halou verzui în care hematiile rămîn intacte. Colonii α-hemolitice formează.) streptococii viridans, pneumococii, unii enterococi şi streptococi piogeni animali.

- Colonii nehemolitice - streptococi nehemolitici.

.) Tulpinile de S.pyogenes care nu elaborează streptolizină S (întîlnite relativ rar) formează după incubarea aerobă colonii α-hemolitice sau cu hemoliză parţială.

Pneumococii formează colonii mai transparente decît streptococii viridans sau enterococii. Tulpinile capsulate, virulente formează colonii mucoide. Tulpinile necapsulate, avirulente formează colonii S sau R. După 36-90 ore cultura de pneumococ se autolizează determinînd apariţia unei depresiuni în centrul coloniei. Subliniem că aspectul culturii nu permite decît o diferenţiere prezumptivă a pneumococilor de streptococii viridans sau enterococi.

O mică parte din tulpinile de S.pyogenes şi pneumococ necesită la izolarea din organism incubarea în atmosferă cu 5-10% CO_2 (vezi capitolul 3, p.60).

(ii) Pe geloză sînge după incubare anaerobă se dezvoltă toţi streptococii formînd colonii puţin mai mari decît după incubarea aerobă iar zonele de β-hemoliză*) sînt mai largi. După incubarea anaerobă pneumococii formează colonii β-hemolitice.

Streptococii obligat anaerobi dezvoltă după 48-72 ore de incubare la 37°C colonii mici nehemolitice.

*) Tulpinile de S.pyogenes care în incubarea aerobă formau colonii α-hemolitice sau cu hemoliză parţială formează după incubarea anaerobă colonii β-hemolitice (activarea streptolizinei O).

Identificarea antigenică a streptococilor β-hemolitici

Pe baza unui antigen somatic de grup, polizaharidul C, streptococii sînt împărțiți în grupe serologice denumite cu literele majuscule ale alfabetului de la A la O (exceptînd I şi J). In afara streptococilor β-hemolitici în gruparea serologică sînt cuprinşi şi unii dintre streptococii α-hemolitici posesori ai polizaharidului C (streptococii piogeni animali, enterococii din care unii sînt α-hemolitici iar alţii β-hemolitici - a se vedea tabelul 3).

Streptococcus pyogenes este streptococ β-hemolitic grup A.

Streptococii piogeni animali, care determină accidental infecţii la om, aparţin grupelor B, C, E ş.a. (tabelul 3).

Dintre infecţiile umane cu streptococi β-hemolitici pe primul loc ca frecvenţă şi gravitate a complicaţiilor se situează cele cu streptococi β-hemolitici grup A. De aceea, odată stabilită prezenţa streptococului β-hemolitic într-un produs patologic se impune identificarea grupului antigenic - demonstrarea apartenenţei la grupul A.

Identificarea grupului antigenic al streptococilor se face prin reacţia de precipitare inelară folosind seruri specifice de grup şi un extract an-

tigenic din cultura tulpinii de identificat (vezi capitolul 6, p.87).

O identificare prezumptivă a streptococilor grup A se poate efectua mai economic prin testul de sensibilitate la bacitracină.

Testul de sensibilitate la bacitracină pentru identificarea economică şi prezumptivă a streptococilor din grupul A.

Tulpina de identificat se însămînţează în striuri paralele, dense pe un sector al unei plăci cu geloză sînge. In mijlocul ariei însămînţate se depune un microcomprimat conţinînd o,5 u bacitracină. In continuare, plăcile sînt incubate peste noapte la 37°C.

Tulpinile bacitracin sensibile (diametrul zonei de inhibiţie mai mare de 1o mm) sînt raportate aparţinînd grupului A.

Streptococii grup A sînt sensibili la bacitracină în proporţie de 98,3% în timp ce restul streptococilor β-hemolitici sînt rezistenţi în proporţie de 97,5%

Identificarea pneumococilor. Diferenţierea de alţi streptococi α-hemolitici.

Caracterele morfo-tinctoriale ca şi cele ale culturii sînt numai prezumptive pentru identificarea pneumococilor. Teste de certitudine utilizate curent pentru această identificare sînt*) :
(i) virulenţa pentru şoarece, (ii) sensibilitatea

---

*) Reacţia de umflare a capsulei, cel mai specific test de identificare a pneumococilor, necesită seruri faţă de toate cele 87 de tipuri antigenice ale pneumococilor. De aceea, nu poate fi un test pentru identificarea de rutină a pneumococilor.

la optochin, (iii) solubilitatea în bilă şi (iv) fermentarea inulinei.

(i) Virulenţa pentru şoarece

Spre deosebire de enterococi şi streptococii viridans, pneumococii capsulaţi sînt virulenţi pentru şoarece.

Inoculaţi la şoarece intra-peritoneal (produse patologice normal sterile şi culturi pure) sau subcutanat (spută şi alte produse normal contaminate) pneumococii determină o infecţie septicemică mortală în 24-48 ore. La necropsie, pneumococii pot fi izolaţi în hemocultură iar examenul microscopic îi evidenţiază pe frotiurile din splină, ficat şi sînge.

(ii) Sensibilitatea la optochin. Testul este aplicabil şi pe cultură primară.

Tulpina de identificat se însămînţează dens, în striuri paralele, pe un sector al unei plăci cu geloză sînge. In centrul ariei însămînţate se depune o rondelă de hîrtie de filtru de 5 mm diametru impregnată cu 0,02 ml dintr-o soluţie 1/5000 optochin . Se incubează peste noapte la 37°C. Pneumococii prezintă o zonă de inhibiţie cu diametrul de minimum 15 mm.

Testul permite identificarea a peste 90% din tulpinile de pneumococi.

(iii) Solubilitatea în bilă. Agenţii tensioac-

tivi, cum sînt bila, sărurile biliare, acţionează asupra peretelui celular al pneumococilor şi determină liza acestora, tradusă prin clarificarea suspensiei bacteriene. Testul este pozitiv numai cu cultura vie a pneumococilor virulenţi (capsulaţi).

Cultura de 18 ore a tulpinii de testat în bulion cu 5% ser de cal este centrifugată şi apoi resuspensionată în ser fiziologic. Se controlează pH-ul. Dacă este acid se neutralizează - pH-ul acid poate inhiba reacţia de biloliză. Suspensia astfel obţinută este împărţită în 2 tuburi de aglutinare sterile. Intr-unul din tuburi se adaugă 4 picături din soluţia 10% dezoxicolat de sodiu. In celălalt tub, martorul, se adaugă un număr egal de picături de ser fiziologic. Ambele tuburi se incubează la baia de apă la 37°C. Se face o citire după 10 min. şi alta după 1 oră. Testul este pozitiv dacă în acest interval suspensia din tubul la care s-a adăugat sarea biliară se clarifică iar martorul rămîne opalescent.

(iv) Fermentarea inulinei se studiază pe mediul Hiss cu ser. Inulina este fermentată de majoritatea tulpinilor de pneumococ*).

De la toate aceste teste există excepţii privind atît comportarea pneumococilor cît şi a streptococilor α-hemolitici. De aceea, pentru identificarea pneumococilor nu se recurge numai la un singur test ci se coroborează rezultatele a 2 sau mai multe teste.

---

*) Unele tulpini de streptococi α-hemolitici (S.sanguis şi S.salivarius) fermentează de asemenea inulina.

Identificarea streptococilor α-hemolitici

Enterococii α-hemolitici se diferenţiază de streptococii viridans prin

(i) apartenenţa lor la grupul serologic D;

(ii) capacitatea de a cultiva pe medii cu 4o% bilă şi de a fermenta esculina (testul esculină-bilă pozitiv pentru enterococi);

(iii) supravieţuirea după încălzirea 3o min. la 60°C (testul de rezistenţă termică pozitiv pentru enterococi).

Testul esculină-bilă. Tulpina de identificat se însămînţează pe o placă cu geloză-sînge cu 4o% bilă, esculină şi citrat de fier ca indicator. Apariţia de colonii negre, cu halou negru indică o reacţie pozitivă.

Testul de rezistenţă termică. Pe 2 sectoare ale unei plăci cu geloză sînge se repică cultura în bulion ser a tulpinii de identificat înainte şi după încălzirea 3o min. la 60°C pe baia de apă. Se incubează peste noapte la 37°C. Apariţia culturii în cele 2 sectoare indică rezistenţa termică a tulpinii testate. Apariţia culturii exclusiv în sectorul în care s-a repicat cultura înainte de încălzire indică sensibilitatea termică a tulpinii.

Alte teste biochimice permit identificarea speciilor de enterococi şi streptococi viridans. Cei interesaţi în acest sens pot consulta cu folos bibliografia indicată.

Antibiograma

Streptococii sînt natural sensibili la toate

antibioticele active asupra bacteriilor gram-pozitive.

Streptococcus pyogenes, pneumococii şi streptococii anaerobi şi-au păstrat sensibilitatea naturală la penicilină.

> Pentru administrarea penicilinei, antibioticul de elecţie, în infecţiile cu Streptococcus pyogenes şi pneumococi antibiograma nu este necesară. In septicemii rămîne însă necesară determinarea CMI a penicilinei faţă de tulpina infectantă.

Sensibilitatea reală la antibiotice a tulpinilor de streptococi viridans şi de enterococi este variată datorită rezistenţei dobîndite. De aceea, antibiograma se impune pentru toate tulpinile de streptococ viridans şi enterococ izolate de la bolnav şi demonstrate a fi tulpini infectante. Pentru antibioterapia acestor infecţii antibiograma trebuie să controleze şi efectul asociaţiei penicilină + streptomicină care se demonstrează frecvent sinergică.

> In concluzie
>
> Streptococcus pyogenes este identificat pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, ale culturii pe geloză-sînge şi apartenenţei la grupul serologic A. Antibiograma nu este necesară pentru terapia cu penicilină a infecţiilor cu S.pyogenes.

Identificarea enterococilor se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură pe geloză-sînge, apartenenței la grupul serologic D și a caracterelor biochimice. Antibiograma este indispensabilă pentru terapia infecțiilor cu enterococi.

Identificarea streptococilor viridans se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură pe geloză-sînge și biochimice. Antibiograma este indispensabilă pentru terapia infecției cu streptococi viridans.

Identificarea pneumococilor se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură pe geloză-sînge, virulenței pentru șoarece, sensibilității la optochin, solubilității în bilă, fermentării inulinei. Antibiograma este necesară numai pentru infecțiile septicemice cînd se fac determinări cantitative.

Identificarea streptococilor anaerobi se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale și de cultură.

Neisseria gonorrhoeae
Neisseria meningitidis
Neisserii „nepretențioase"
Branchamella catarralis
Veillonella

Cocii gram-negativi aerobi sînt reuniţi în genurile Neisseria şi Branchamella ale familiei Neisseriaceae.

Cocii gram-negativi anaerobi sînt reuniţi în familia Veillonellaceae.

Neisseria gonorrhoeae o urmărim şi trebuie să o identificăm în produsele patologice ale infecţiilor pe care le determină: puroiul uretral în uretritele acute purulente ale bărbatului, exsudatul de la nivelul colului uterin în cervicite la femei (infecţii adesea asimptomatice), exsudatul conjunctival în oftalmia noului născut, exsudatul vulvo-vaginal în vulvo-vaginitele fetiţelor; în exsudatele articulare, hemoculturi, lcr ş.a. în cursul complicaţiilor infecţiei gonococice.

Omul este singura gazdă pentru N.gonorrhoeae.

Neisseria meningitidis o urmărim şi trebuie să o identificăm în produsele patologice ale infecţiilor pe care le determină: în lcr şi în hemoculturile de la bolnavii cu meningită purulentă. Ocazional determină infecţii respiratorii şi a fost evidenţiată în spută.

N.meningitidis este prezentă şi în nazo-faringe la purtători sănătoşi.

Omul este singura gazdă pentru N.meningitidis.

Neisseriile comensale şi Branchamella catarrhalis sînt normal prezente pe mucoasa bucală, faringiană, genito-urinară şi în intestinul omului şi animalelor. De aceea, apar ca contaminanţi normali ai probelor de exsudat faringian, spută, exsudate genitale ş.a.

Ocazional, au fost izolate din spută, aspirate traheale şi pulmoni în infecţii respiratorii, din lcr în unele meningite.

Speciile de Veillonellaceae, în calitate de comensale ale mucoaselor respiratorie superioară, intestinală şi genito-urinară, pot contamina normal probele de exsudat faringian, spută, exsudate genitale.

Frotiul Gram din produse patologice evidenţiază diplococi gram-negativi, ovalari, cu axul lung paralel (diplococi „în boabe de cafea"). Majorita-

tea sînt dispuşi intracelular (fig.47 a,b).

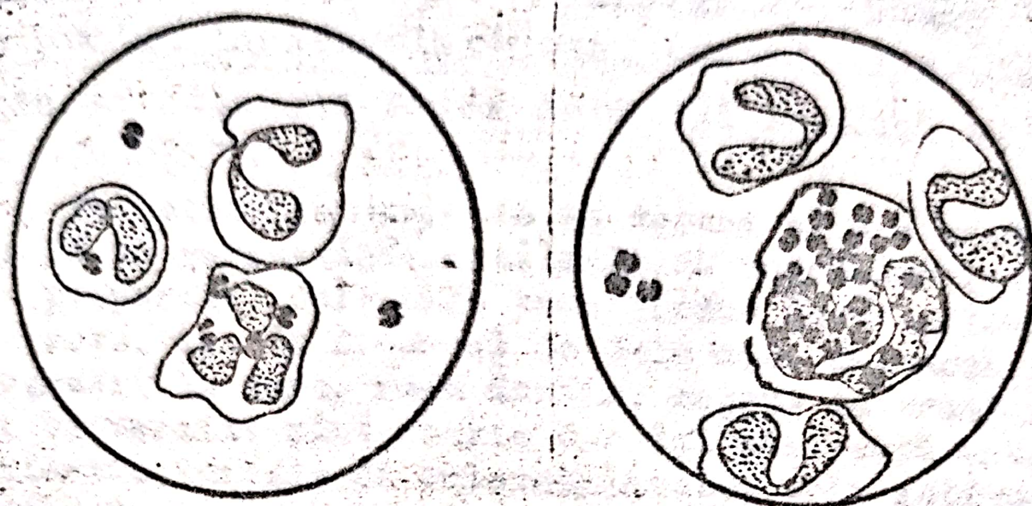


Fig.47 a - Meningococ: frotiu din lcr; b - gonococ: frotiu din puroi uretral (schematic)

Cracteristic pentru infecţia gonococică acută este numărul mare de diplococi prezenţi în citoplasma polinucleareIor şi macrofagelor (celule „burate" cu diplococi). In infecţiile gonococice cronice această aşezare caracteristică dispare iar cocii, rari pe frotiu, prezintă o morfologie aberantă (coci sferici, giganţi, inegali ca mărime ş.a.).

Cultura

(i) Pe geloză-sînge la 37°C în aerobioză şi atmosferă umedă cu 5-10% CO_2 (alte medii îmbogăţite recomandate pentru cultivarea neisseriilor patogene: mediul Mueller-Hinton, geloză chocolat cu extract de levură etc.).

Meningococul şi gonococul formează, după 24 ore

ţea sînt dispuşi intracelular (fig.47 a,b).

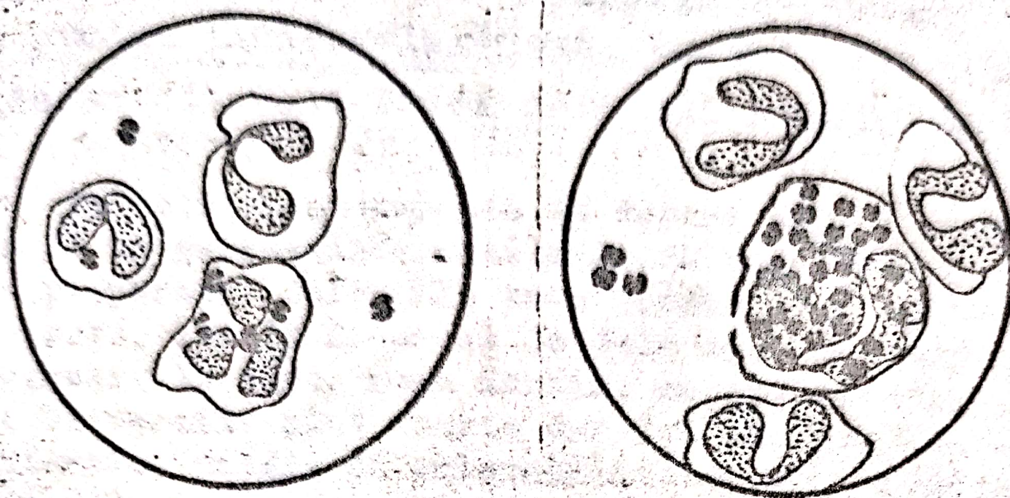


Fig.47 a - Meningococ: frotiu din lcr;
b - gonococ: frotiu din puroi uretral
(schematic)

Cracteristic pentru infecţia gonococică acută este numărul mare de diplococi prezenţi în citoplasma polinucleareIor şi macrofagelor (celule „burate" cu diplococi). In infecţiile gonococice cronice această aşezare caracteristică dispare iar cocii, rari pe frotiu, prezintă o morfologie aberantă (coci sferici, giganţi, inegali ca mărime ş.a.).

Cultura

(i) Pe geloză-sînge la 37°C în aerobioză şi atmosferă umedă cu 5-10% CO_2 (alte medii îmbogăţite recomandate pentru cultivarea neisseriilor patogene: mediul Mueller-Hinton, geloză chocolat cu extract de levură etc.).

Meningococul şi gonococul formează, după 24 ore

de incubare, colonii S de 1-2 mm diametru, rotunde sau lobate, lucioase, cenuşii sau incolore, nehemolitice.

Dacă cultura nu se dezvoltă după 24 ore, plăcile se reincubează în continuare pînă la 48 ore.

Bacterii fragile, sensibile la rece, meningococul şi gonococul sînt greu de menţinut în cultură. După examinarea culturii plăcile se reintroduc în termostat.

Neisseriile comensale formează colonii cu aspecte variate: rotunde, lucioase, cenuşii sau incolore; rotunde sau lobate şi cu suprafaţa uscată, granulată sau cutată, cenuşii sau pigmentate în galben sau galben verzui, consistente, greu emulsionabile.

Spre deosebire de meningococ şi gonococ, neisseriile comensale sînt „nepretenţioase": cultivă şi la 22°C pe medii simple (tabelul 4).

(ii) Pe geloză sînge în anaerobioză la 37°C se dezvoltă Veillonelaceae-le. Multe tulpini de Neisseria sînt strict aerobe şi nu se dezvoltă, iar cele facultativ anaerobe formează colonii foarte mici.

Frotiul Gram din cultură evidenţiază coci gram-negativi, sferici sau în boabă de cafea, inegali ca mărime, aşezaţi izolat, în perechi şi, cel mai frecvent, în grămezi mari. Frotiul din cultura neisseriilor patogene evidenţiază frecvent coci dezintegraţi ca urmare a autolizei.

In culturi mixte reperarea coloniilor de Neisseria se face uşor prin reacţia oxidazei. Neisseriile produc indofenoloxidază, enzimă capabilă de a oxida un colorant redox care îşi schimbă culoarea.

Pe coloniile suspecte se depune cîte o ansă din soluţia 1% de para-aminodimetilanilină monohidroclorică proaspăt preparată. Coloniile care produc indofenoloxidază devin roze, iar în interval de 5-10 min. culoarea evoluează progresiv la maro, roşu închis, negru. In acest ultim stadiu bacteriile sînt moarte dar îşi păstrează caracterele morfo-tinctoriale şi colorabilitatea prin anticorpi fluorescenţi. Repicarea coloniei trebuie făcută în stadiul de culoare roz.

Diferenţierea gonococului de meningococ se face pe baza următoarelor teste:

(i) Spectrul de fermentare a zaharurilor (vezi tabelul 4).

(ii) Colorarea directă cu anticorpi fluorescenţi este o metodă rapidă de identificare a meningococului şi gonococului pe frotiurile din produse patologice sau din culturile tinere în care mai persistă antigenele de suprafaţă (singurele specifice).

Antibiograma. Neisseriile sînt natural sensibile la antibioticele cu spectrul penicilinelor de biosinteză şi la antibioticele cu spectru larg. Penicilina rămîne antibioticul de elecţie în tratamentul infecţiilor meningococice şi gonococice.

Tabelul 4

Caractere diferențiale ale speciilor de *Neisseria* și *Branhamella*

Specia	Cultivarea pe geloză-sînge	Cultivarea pe geloză-nutritivă la 22°C	Reacții fermentative: glucoză	maltoză	zaharoză	lactoză	fructoză	manită
N.meningitidis	+	−	+	+	−	−	−	−
N.gonorrhoeae	+	−	+	−	−	−	−	−
N.lactamica	+		+	+	−	(+)	−	−
N.sicca	+	+	+	+	+	−	+	−
N.flava	+	+	+	+	−	−	+	−
N.perflava	+	+	+	+	+	−	+	+
N.subflava	+	+	+	+	−	−	−	−
N.flavescens	+	+	−	−	−	−	−	−
B.catarrhalis	+	+	−	−	−	−	−	−

Legenda: + = cultivare, respectiv fermentare
− = lipsa culturii, respectiv fermentării
( ) = reacție lentă

In concluzie

Neisseriile patogene, meningococul şi gonococul, se diferenţiază de neisseriile comensale pe baza caracterelor de cultură şi a exigenţelor nutritive.
Pentru diferenţierea meningococului de gonococ se cercetează spectrul de fermentare al zaharurilor sau se recurge la coloraţia directă cu anticorpi fluorescenţi.

13 IDENTIFICAREA BACILILOR INTESTINALI GRAM-NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI

Salmonella
Shigella
Escherichia
Klebsiella
Proteus
Yersinia
Vibrio cholerae

Bacilii intestinali•) gram-negativi facultativ anaerobi sînt reuniţi în familia Enterobacteriaceae şi în genul Vibrio al familiei Vibrionaceae.

Slamonella, Shigella, Yersinia pestis şi Vibrio cholerae sînt patogeni. Restul sînt saprofiţi oportunişti care, de la nivelul intestinului, la pacienţi cu deficienţe ale apărării antiinfecţioase, pot invada alte regiuni ale organismului determinînd infecţii cu gravitate variată.

Mai frecvent izolate din infecţii sînt genurile Salmonella, Shigella, Escherichia, Klebsiella, Proteus.

Frotiul Gram din produse patologice. Are valoare numai pentru produsele care provin din zone nor-

•) Yersinia pestis este singura specie de Enterobacteriaceae care nu habitează intestinul.

mal sterile. Evidenţiază bacili gram-negativi uneori capsulaţi.

Morfotinctorial, între Enterobacteriaceae nu pot fi făcute diferenţieri.

Cultura pe medii uzuale nu aduce date suficiente pentru diferenţierea enterobacteriaceelor. Pe geloză nutritivă sau geloză-sînge toate, exceptînd Proteus (vezi p. 173) şi Yersinia (vezi p. 175) formează după 24 ore la 37°C colonii mari, S, rotunde, uşor convexe, cenuşiu-translucide. Aceleaşi caractere le are şi cultura pe medii cu bilă (pe aceste medii şi Proteus formează colonii nedistincte de ale altor Enterobacteriaceae).

Tulpinile capsulate formează colonii mucoide.

Izolarea Enterobacteriaceae-lor

(i) Din materiile fecale şi alte produse normal contaminate

Salmonella şi Shigella se izolează pe medii selective (agar-dezoxicolat-citrat, mediul SS ş.a.). Prezenţa acestor patogeni eventual în număr redus impune însămînţarea probelor şi într-un mediu de îmbogăţire cu repicarea pe un mediu selectiv după 24 ore de incubare la 37°C.

Enterobacteriaceae-le saprofite se izolează pe medii slab selective (mediu Mac Conkey ş.a.) sau,

mai bine, numai diferenţiale (mediul Drigalski ş.a.)

Toate aceste medii, selective şi diferenţiale, conţin lactoză şi diferenţiază Enterobacteriaceae-le în lactozo-pozitive şi lactozo-negative.

Enterobacteriaceae lactozo-pozitive: Escherichia, Klebsiella ş.a.
Enterobacteriaceae lactozo-negative: Shigella, Salmonella, Proteus, Yersinia ş.a.

(ii) Din produse normal sterile

Enterobacteriaceae-le se izolează pe geloză-sînge şi bulion glucozat (în suspiciunea de febră enterică hemocultura se face în bulion-bilă). Insămînţarea pe medii diferenţiale lactozate este facultativă.

Triajul preliminar al izolaţilor

Permite orientarea rapidă şi economică asupra identităţii probabile a izolaţilor. Aspectul este important pentru izolarea şi identificarea shigellelor şi salmonellelor din probele de materii fecale: pe mediile de izolare coloniile lactozo-negative ale enterobacteriaceelor patogene nu pot fi deosebite de cele ale enterobacteriaceelor saprofite (Proteus ş.a.) pentru care identificarea completă nu este necesară.

Mediul Hajna este o geloză nutritivă care conţine 2 zaharuri - glucoza şi lactoza -, roşu fenol

ca indicator pentru fermentare și sulfat feros ca indicator pentru producerea de H_2S. Mediul se repartizează în tuburi în coloană și pantă. Mediul neînsămînțat are culoarea roșie ca cireașa. Insămînțarea se face, cu acul, prin înțepare în coloană și etalare pe pantă. După 18-24 ore la 37°C se face citirea tuburilor (tabelul 5).

Tabelul 5

Citirea reacțiilor pe mediul Hajna

Reacția	Explicația
Coloana acidă (galbenă) Panta alcalină (roșie)	Fermentată numai glucoza•)
Coloana și Panta acide (galbene)	Fermentate glucoza și lactoza
Coloana și Panta alcaline (roșii)	Cultură nefermentativă
Bule de gaz în coloană	Cultură aerogenă
Innegrire în coloană	Producere de H_2S

•) Pentru a permite detectarea culturilor care fermentează numai glucoza, în mediu raportul între glucoză și lactoză este 1:lo. Astfel, fermentarea glucozei duce la apariția unor cantități reduse de acizi care sînt oxidați rapid în panta care rămîne alcalină.

Mediul pentru evidențierea ureazei: vezi capitolul 4, p.71.

Stabilirea identităţii probabile a izolaţilor în funcţie de rezultatele reacţiilor pe mediile de triaj preliminar este prezentată în tabelul 6.

Identificarea Enterobacteriaceae-lor lactozo-pozitive

(i) Izolate din materii fecale. Dacă proba provine de la un adult, coloniile lactozo-pozitive sînt trecute cu vederea*): sînt saprofiţi de contaminare normală.

In probele diareice de la copii sub 2 ani se urmăreşte prezenţa tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli. Acestea sînt tulpini posesoare a fracţiunii antigenice B (tabelul 7). Biochimic nu pot fi diferenţiate de restul tulpinilor. Se identifică numai antigenic.

Tabelul 7

Tipurile enteropatogene de Escherichia coli circulante în România

Esch.	coli	$O_{26}B_6$	Esch.	coli	$O_{124}B_{17}$
"	"	$O_{55}B_5$	"	"	$O_{125}B_{15}$
"	"	$O_{86}B_6$	"	"	$O_{126}B_{16}$
"	"	$O_{111}B_4$	"	"	$O_{127}B_8$
"	"	$O_{119}B_{14}$	"	"	$O_{128}B_{12}$

*) Rarele excepţii de la această regulă vor fi discutate în capitolul 32.

Tabelul 6

Identitatea probabilă a bacililor intestinali gram-negativi facultativ anaerobi în funcţie de rezultatele triajului biochimic preliminar

Reacţii pe mediu Hajna	Reacţii pe mediu Christensen: Urează pozitiv	Reacţii pe mediu Christensen: Urează negativ
	Identitatea probabilă	
Panta: acid lactoză + Coloana: acid glucoză + Coloana: gaz sau , H_2S -	Klebsiella (lent) Enterobacter Escherichia Citrobacter H_2S -	Enterobacter
Panta: acid lactoză + Coloana: acid glucoză + Coloana: gaz + , H_2S +	Citrobacter H_2S + Arizona (lactozo-pozitiv)	
Panta: alcalin lactoză - Coloana: acid glucoză + Coloana: gaz + , H_2S +	Salmonella Arizona Citrobacter (Bethesda) Edwardsiella	Proteus hauseri
Panta: alcalin lactoză - Coloana: acid glucoză + Coloana: gaz + , H_2S -	Escherichia (lactozo -)	Proteus morganii Proteus rettgeri
Panta: alcalin lactoză - Coloana: acid glucoză + Coloana: gaz - , H_2S -	Salmonella*) Shigella Escherichia (lactozo -, anaerogenă) Providencia Serratia	Proteus rettgeri
Panta: alcalin lactoză - Coloana: alcalin glucoză - Coloana: gaz - , H_2S -	Pseudomonas sau alţi bacili gram-negativi nefermentativi	

*) Salmonella typhi produce o cantitate mică de H_2S şi numai rar gaz.

- Tiparea serologică. 5 colonii lactozo-pozitive de pe placa de izolare se testează în reacţia de aglutinare pe lamă cu ser polivalent (vezi capitolul 6, p. 91). Dacă reacţia este negativă se mai face o aglutinare cu cultura lactozo-pozitivă confluentă.

Coloniile care au aglutinat cu serul polivalent se repică pe mediul diferenţial lactozat în vederea aglutinării pe lamă cu seruri monovalente. Rezultatele pozitive trebuie verificate prin aglutinare în tuburi (vezi capitolul 6, p. 93).

Dacă cu serul polivalent a aglutinat numai cultura confluentă, repicarea se face dintr-un flocon aglutinat din picătura de ser polivalent.

- Colorarea directă cu anticorpi fluorescenţi a frotiului din proba de materii fecale.

(ii) Izolaţii din produse provenite din zone normal sterile (urină•), spută•), bilă•), sînge, lcr ş.a.) sînt identificaţi biochimic••)

•) Izolaţii din aceste produse se identifică numai atunci cînd există certitudinea implicării lor în procesul infecţios (vezi capitolele 29, 31).

••) Identificarea antigenică, exceptînd cea a tulpinilor enteropatogene de Esch.coli, nu este încă posibilă în laboratoarele de rutină - rămîne de competenţa centrelor de referinţă; deşi, pentru raţiunile expuse la p.169 identificarea tipului serologic al acestor bacterii (în primul rînd Esch.coli) izolate repetat din infecţii urinare ar aduce clinicianului date foarte utile.

Tabelul 8 prezintă reacţiile biochimice care individualizează genurile enterobacteriaceelor lactozo-pozitive.

Klebsiella pneumoniae. Tulpinile tipice dau reacţiile biochimice prezentate în tabelul 8. Pentru multe tulpini însă aceste reacţii sînt variabile. Un test fidel de identificare a K.pneumoniae este patogenitatea pentru şoarece. Soarecii inoculaţi sub-cutanat cu produsul patologic (spută ş.a.) sau intra-peritoneal cu o,1 ml din diluţia 10^{-5} a culturii de 18-24 ore în apă peptonată fac o infecţie septicemică mortală în 24-72 ore. La necropsie bacteria poate fi izolată din sîngele cardiac. Examenul microscopic o evidenţiază pe frotiurile gram din sînge şi splină cu morfologia caracteristică: bacil scurt, gros, gram-negativ, încapsulat(fig.48)

Identificarea Enterobacteriaceae-lor lactozo-negative

(i) Izolaţii din materii fecale. Izolaţii care în testele preliminare de triaj dau reacţii sugestive pentru Salmonella sau Shigella sînt identificaţi în continuare, după ce au fost verificaţi pentru puritatea culturii.

Restul tulpinilor (tulpinile ureazo-pozitive, cele care fermentează glucoza cu gaz şi nu dau H_2S

Tabelul 8

Identificarea biochimică a Enterobacteriaceae-lor lactozo-pozitive

Testul	Escherichia	Citrobacter	Klebsiella pneumoniae	Enterobacter cloacae	Enterobacter aerogenes
Teste primare					
Mobilitate	+ sau −	+	−	+	+
Indol	+	−	−	−	−
Roşu metil	+	+	− sau +	−	−
Voges-Proskauer	−	−	+	+	+
Citrat (mediu Simmons)	−	+	+	+	+
H_2S (mediu Hajna)	−	D	−	−	−
Urează	−	(+)	(+)	+ sau −	−
Carbohidraţi (acid din)					
Inozită	−	−	+G	d	+G
Lactoză	+ sau x	+ sau x	+	+ sau (+)	+
Sucroză	d	d	+	+	+
Teste adiţionale					
Adonită	−	−	+ sau −	− sau +	+
Dulcită	d	+ sau −	− sau +	− sau +	−
Malonat	−	− sau (+)	+	+ sau −	+ sau −
KCN	−	+	+	+	+
Phenilalanină (dezaminază)	−	−	−	−	−
Lizin decarboxilază	+	−	+	−	+
Ornitin decarboxilază	d	d	−	+	+
Arginin dihidrolază	d	+	−	+	−
Gelatină (22°C)	−	−	−	(+) sau −	− sau (+)

Legenda: + = >90% pozitive în 1-2 zile,
− = >90% negative,
(+) = pozitiv tardiv,
+ sau − = majoritatea culturilor pozitive,
− sau + = majoritatea culturilor negative,
x = tîrziu şi neregulat pozitiv,
s = reacţie slab pozitivă,

D = diferite reacţii + (+) − date de diferite specii ale genului,
d = ibid. date de diferite tulpini ale speciei sau serotipuri.

etc.etc.) sînt trecute cu vederea: sînt saprofiţi de contaminare normală.)

(ii) Izolaţii din probe provenite din zone normal sterile (urină..), spută..), bilă..), sînge, lcr ş.a.). Din aceste produse se izolează Salmonella. Dar pot fi izolaţe oricare din celelalte Enterobacteriaceae. Shigella a fost izolată rar din din sînge şi urină.

Identificarea acestor bacterii trebuie condusă pînă la stadiul care să permită

- clinicianului confirmarea diagnosticului clinic (salmonelloză, febră tifoidă, dizenterie) şi diferenţierea recăderii de reinfecţie...).
- epidemiologului confirmarea diagnosticului de epidemie, identificarea tulpinii epidemice....), depistarea purtătorilor sănătoşi de Salmonella sau Shigella.

Salmonella

Identificarea biochimică. Se însămînţează medi-

.) Rarele excepţii de la această regulă vor fi discutate în capitolul 32.

..) Vezi nota .) de la p. 166.

...) In recăderi se reizolează aceeaşi tulpină pe cînd în reinfecţii se izolează tulpini diferite.

....) Tulpinile izolate din epidemie aparţin aceluiaşi serotip, lizotip şi chiar pattern de sensibilitate la antibiotice.

ile pentru testele primare menţionate în tabelul 9. Dacă pe baza acestor rezultate nu poate fi stabilită identitatea tulpinii, se recurge la testele biochimice adiţionale.

Identificarea antigenică*) a unei salmonele începe prin reacţia de aglutinare pe lamă cu ser polivalent anti-O (vezi capitolul 6, p.91).

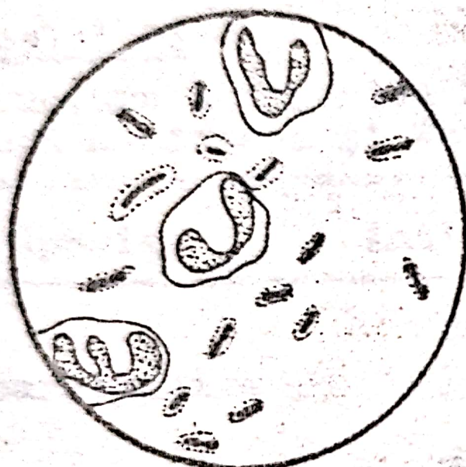


Fig.48 Klebsiella frotiu din sputa unui bolnav cu pneumonie (schematic)

- Dacă această reacţie este pozitivă, identificarea se continuă prin reacţii de aglutinare cu seruri anti-O de grup**). După stabilirea grupului, printr-o reacţie de aglutinare cu seruri anti-H se face identificarea serotipului**).

In tabelul 10 este prezentată structura antigenică a unor salmonele mai frecvent izolate.

- Dacă triajul biochimic preliminar sugerează Salmonella typhi şi izolatul nu aglutinează cu serul polivalent anti-O, se efectuează aglutinarea cu se-

---

*) Salmonelele au largi înrudiri antigenice cu alte Enterobacteriaceae. De aceea, identificarea biochimică este obligatorie şi nu se poate rezuma numai la testele de triaj şi identificarea antigenică.

**) Salmonelele sînt cuprinse în 60 grupe serologice şi au peste 1000 de serotipuri.

Tabelul 9

Identificarea biochimică a *Enterobacteriaceae*-lor lactozo-negative

Testul	Edwardsiella	Salmonella	S.typhi	Arizona*)	Shigella	Serratia	Proteus vulgaris	P.mirabilis	P.rettgeri	P.morganii	Providencia	Yersinia
Teste primare												
Mobilitate (37°)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Indol	+	-	-	-	D	-	+	-	+	+	+	D
H_2S (m.Hajna)	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	D
Urează	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	D
Carbohidraţi (acid din)												
Dulcită	-	D	- sau (+)	-	d	-	-	-	-	-	-	-
Glucoză	+G	+G	+	+G	+**)	d	+G sau -	+G	+	+G	D	+
Lactoză	-	-	-	d	D	- sau (+)	-	-	-	-	-	-
Manită	-	+	+	+	D	+	-	-	+ sau -	-	D	+
Sucroză	-	-	-	-	D	+	+	d	d	-	D	D
Pigment pe geloză	-	-	-	-	-	- sau +	-	-	-	-	-	-
Teste adiţionale												
Salicină	-	-	-	-	-	+	d	d	d	-	-	D
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	+	-	- sau +	-	-	-	-
Citrat (m.Simmons)	-	+	-	+	-	+	d	+ sau (+)	+	-	+	-
Malonat	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Phenilalanină (dezaminează)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Lizin-decarboxilază	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Ornitin-decarboxilază	+	+	+	+	D	+	-	+	-	+	-	D
Arginin-dihidrolază	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatină (22°C)	-	-	-	(+)	-	+	+	+	-	-	-	-

Legenda: vezi subsolul tabelului 8

*) In ed.VIII-a a Bergey's Manual, Arizona îşi pierde individualitatea de gen; i-am păstrat idividualitatea pentru raţiuni privind practica identificării în laboratorul de microbiologie clinică

**) Unele biotipuri de *Sh.flexneri* produc gaz.

rul anti-Vi (antigenul O este mascat de antigenul de înveliş Vi).

Tiparea fagică. In scopuri epidemiologice, pentru unele salmonele (S.typhi, S.paratyphi B, S.typhimurium) se poate efectua tiparea fagică. Sînt determinări de competenţa laboratoarelor de referinţă.

Tabelul lo

Structura antigenică a principalelor salmonele (după Kauffmann şi White)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
	Grupa A		
S.paratyphi A	1,2,12	a	-
	Grupa B		
S.paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
S.typhimurium	1,4,5,12	i	1,2
S.heidelberg	1,4,5,12	r	1,2
	Grupa C_1		
S.paratyphi C	6,7 Vi	c	1,5
S.cholerae-suis	6,7	c	1,5
	Grupa C_2		
S.newport	6,8	c,h	1,2
S.bovis-morbificans	6,8	r	1,5
	Grupa D		
S.typhi	9,12 Vi	d	-
S.enteritidis	1,9,12	g,m	-

Shigella

Shigelele se individualizează pe baza caracterelor biochimice prezentate în tabelul 9.

Genul Shigella cuprinde 4 subgrupe diferite biochimic şi antigenic (tabelul 11).

Tabelul 11

Diferenţierea biochimică a subgrupelor (speciilor) de Shigella

Subgrupa	Specia	Lactoză	Manită	Indol	Serotipuri
A	Sh.dysenteriae	-	-	d	10
B	Sh.flexneri	-	+	d	6
C	Sh.boydii	-	+	d	15
D	Sh.sonnei	(+)	+	-	1

Legenda = vezi tabelul 8

Identificarea antigenică a shigelelor presupune o reacţie de aglutinare pe lamă cu seruri de grup (A, B, C, D). In cadrul fiecărei subgrupe, serotipurile sînt stabilite prin reacţia de aglutinare pe lamă cu seruri monovalente.

Proteus

Se individualizează de restul enterobacteriaceelor prin caracterul invaziv al culturii la suprafaţa mediului. Acest caracter nu se manifestă pe mediile selective cu bilă sau săruri biliare.

Identificarea celor 4 specii de Proteus se face pe baza caracterelor biochimice prezentate în

tabelul 9. Importanța acestei identificări pentru tulpinile infectante decurge din faptul că infecțiile cu Proteus mirabilis beneficiază de terapia cu penicilină.

Yersinia

Genul se individualizează prin caracterele biochimice prezentate în tabelul 9. Caracterele pe baza cărora se diferențiază cele 3 specii ale genului, Y.pestis, Y.pseudotuberculosis și Y.enterocolitica, apar în tabelul 12.

Tabelul 12

Caractere distinctive între speciile de Yersinia (după Cowan, 1975).

Testul	Y.pestis	Y.pseudo-tuberculosis	Y.entero-colitica
Mobilitate			
22°C	-	+	+
37°C	-	-	-
Urează	-*	+	+
Esculină	+	+	-
Rhamnoză	(d)	+	-
Salicină	d	+	-
Sucroză	-	-	+
Gaz din glucoză	-	-	-
β-galactozidază	+	+	+
Ornitin decarboxilază	-	-	+
Indol	-	-	d

Legenda = vezi tabelul 8

*) Uneori pozitivă cu tulpini proaspăt izolate.

Yersinia pestis, agentul etiologic al ciumei sau pestei, este urmărită şi trebuie identificată în puroiul sau serozitatea ganglionară în forma bubonică, în spută în forma pneumonică şi în sînge în forma septicemică a pestei şi în cadavrele şobolanilor.

Frotiul gram din produs patologic evidenţiază bacili gram-negativi scurţi, uneori pleomorfi, izolaţi, în perechi, rar în scurte lanţuri.

Pe frotiurile colorate Giemsa bacilii apar coloraţi bipolar.

Colorarea cu anticorpi fluorescenţi a frotiurilor din produs patologic sau cultură tînără permite identificarea prezumptivă, rapidă a Y.pestis

Cultura. Pe geloză nutritivă cultivă lent. Pe geloză sînge după 24 ore de incubare aerobă la 37°C formează colonii S, mici, transparente, nehemolitice.

Identificarea se face pe baza caracterelor biochimice prezentate în tabelul 12.

Y.pestis inoculată sub-cutan sau intra-peritoneal la cobai, şoarece sau şobolanul alb determină o infecţie septicemică mortală.

Manipularea produselor patologice, a cadavrelor de şobolani şi culturilor de Y.pestis şi a animalelor inoculate se face cu măsuri de precauţie deosebite (dezinsecţia cadavrelor şi animalelor, mască, ochelari, mănuşi, evitarea aerosolilor ş.a.)

Yersinia pseudotuberculosis, agentul etiologic al pseudotuberculozei rozătoarelor, este izolată în ganglionii mezenterici şi intestinul animalelor bolnave şi al purtătorilor sănătoşi. Ajunsă accidental, la om poate determina adenite mezenterice şi, rar, septicemii fulgerătoare.

Yersinia enterocolitica poate ajunge, din ...

rezervorul animal în intestinul omului la care determină uneori adenite mezenterice sau enterocolite.

Identificarea acestor specii se face pe baza caracterelor rezumate în tabelul 12.

Antibiograma. Enterobacteriaceae-le sînt natural sensibile la antibioticele cu spectru larg şi la antibioticele active numai asupra bacililor gram-negativi.

Proteus mirabilis este natural sensibil la penicilina G.

Larga circulaţie a fR printre aceste bacterii are ca rezultat apariţia de variante şi, ca urmare a selecţionării acestora, de tulpini multirezistente la antibiotice. De aceea antibiograma se impune ca o necesitate pentru stabilirea antibioterapiei infecţiilor cu aceste bacterii.

> În concluzie
>
> Identificarea Enterobacteriaceae-lor patogene izolate din materii fecale se face pe baza caracterelor de cultură pe medii selectiv-diferenţiale lactozate, a caracterelor biochimice şi a structurii antigenice. Antibiograma este necesară pentru stabilirea unei antibioterapii raţionale a acestor infecţii.

Identificarea Enterobacteriaceae-lor izolate din produse provenite din zone normal sterile se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură, biochimice şi a structurii antigenice. Antibiograma este necesară pentru stabilirea unei antibioterapii raţionale a acestor infecţii.

./.

14 IDENTIFICAREA BACILIILOR GRAM-NEGATIVI AEROBI NEFERMENTATIVI

Pseudomonas
Alcaligenes
Acinetobacter
Moraxella

Din această categorie de bacterii, cel mai frecvent izolat din infecţii este Pseudomonas aeruginosa (bacilul piocianic). Saprofit oportunist, bacilul piocianic determină în special infecţii exogene (infecţii ale plăgilor şi arsurilor, infecţii urinare după instrumentaţii ale căilor urinare ş.a.), majoritatea în mediu spitalicesc la pacienţi cu deficienţe în apărarea antiinfecţioasă.

Este relativ frecvent izolat ca saprofit de contaminare din materiile fecale, mai ales de la pacienţi spitalizaţi şi trataţi cu antibiotice. In aceste condiţii, la copilul mic poate determina şi enterocolite. Pe medii selective şi diferenţiale cu lactoză formează colonii lactozo-negative care se pot confunda cu cele ale enterobacteriaceelor patogene. Repicate pe mediile de triaj, nu fermentează nici lactoza, nici glucoza (vezi tabelul 6).

Identificarea practică a bacilului piocianic se face pe baza caracterelor de cultură. Pe geloză nutritivă dezvoltă după 24 ore de incubare aerobă la 37°C colonii mari, cu margini neregulate şi

tendință de a invada mediul în imediata vecinătate, ușor convexe, cu luciu metalic, colorate caracteristic în albastru-verzui ca urmare a elaborării de piocianină și fluoresceină, pigmenți difuzibili în mediu. Cultura degajă un miros caracteristic de iasomie. Pe geloză-sînge coloniile sînt hemolitice.

Aproximativ 4% din tulpinile bacilului piocianic nu produc piocianină. Se diferențiază de alte specii de Pseudomonas prin capacitatea de a oxida gluconatul în ketogluconat, de a cultiva la 42°C și de a cultiva pe medii cu cetrimid.

Pentru amănunte privind identificarea bacililor gram-negativ aerobi nefermentativi mai rar implicați în patologia infecțioasă (Ps.pseudomallei, agentul etiologic al melioidozei, boală întîlnită în Sud-Estul Asiei, Ps.mallei, agentul etiologic al morvei, zoonoză rar întîlnită la om, Alcaligenes, Acinetobacter, Moraxella) cei interesați pot consulta cu folos bibliografia indicată (Bailey și Scott, 1974; Buttiaux și colab., 1969).

Antibiograma. Bacilul piocianic este natural sensibil la antibioticele active asupra bacililor gram-negativi și la antibioticele cu spectru larg. Prin transfer de factor R dezvoltă repede rezistență la multiple antibiotice. De aceea, antibioterapia infecțiilor cu bacil piocianic impune imperios antibiograma.

In concluzie

Identificarea bacilului piocianic se face în principal pe baza caracterelor de cultură. Studiul caracterelor biochimice este necesar pentru identificarea tulpinilor nepigmentogene. Antibiograma este indispensabilă pentru antibioterapia infecțiilor cu bacil piocianic

./.

15 IDENTIFICAREA COCOBACILILOR GRAM-NEGATIVI AEROBI SAU FACULTATIV ANAEROBI

Haemophilus
Pasteurella
Bordetella
Brucella
Franciselia

Cu interes pentru patologia infecţioasă sînt cocobacilii gram-negativi facultativ anaerobi din genurile*) Haemophilus şi Pasteurella şi cei aerobi din genurile*) Bordetella, Brucella şi Franciseila.

Mai frecvent implicate în infecţiile omului sînt speciile de Haemophilus şi Bordetella.

Pasteurella, Brucella şi Francisella determină zoonoze şi numai accidental infecţii ale omului.

Genul Haemophilus

Genul Haemophilus reuneşte cocobacili gram-negativ dependenţi de 2 factori de creştere prezenţi în sînge:

---

*) Genuri cu afiliere incertă, conform Manualului Bergey, ed.a 8-a, 1975. Curent, sînt reunite sub numele generic de Parvobacteriaceae, denumire care nu desemnează însă o categorie taxonomică.

factorul X, o substanţă termostabilă care este hemina,

factorul V sau vitaminic, o substanţă termolabilă care este coenzima I (nicotin-amid-adenin-dinucleotid = NAD). Factorul V este furnizat şi de cultura unor bacterii cum este stafilococul auriu.

Haemophilus influenzae

Este un comensal oportunist al căilor respiratorii superioare. La copilul mic (2 luni-3 ani) determină infecţii mai frecvente şi mai grave decît la adulţi. In calitate de contaminant normal, poate fi izolat în cantităţi reduse din exsudatul faringian şi spută.

Ca bacterie infectantă, este urmărit şi trebuie identificat în produsele patologice ale infecţiilor pe care le determină: sputa în infecţiile căilor respiratorii inferioare, exsudatul laringian în epiglotita şi laringo-traheita obstructivă a copilului mic, lcr în meningitele purulente ale copilului şi rar ale adultului, sîngele în septicemii, exsudatul conjunctival în conjunctivite.

Frotiul Gram din produs patologic evidenţiază cocobacili gram-negativ, obişnuit capsulaţi, aşezaţi izolat sau în scurte lanţuri.

Cultura apare după 24 ore la 37°C.

Pe geloză-sînge cu striu de stafilococ auriu, la izolarea din organism, dezvoltă colonii mici, S, transparente, nehemolitice, satelite culturii de

stafilococ. Coloniile din imediata vecinătate a culturii de stafilococ dispun de o cantitate sporită de factor V şi sînt mai mari decît cele de la distanţă.)

Se dezvoltă bine pe geloză chocolat (încălzirea sîngelui la 80°C favorizează eliberarea în mediu a factorilor X şi V şi distruge enzimele care inactivează factorul V).

Reacţii de aglutinare, de precipitare sau umflare a capsulei cu seruri imune specifice permit identificarea celor 6 tipuri antigenice (a,b,c,d,e,f). In subculturi pierde capsula şi dezvoltă colonii R care nu pot fi identificate antigenic.

H.haemolyticus, H.parainfluenzae, H.parahaemolyticus sînt comensali oportunişti care pot contamina normal probele de exsudat faringian şi spută. Rar sînt cauza unor infecţii respiratorii. Tot rar, ultimile 2 specii au fost izolate în hemoculturi de la bolnavi cu endocardită subacută.

Diferenţierea speciilor hemolitice de streptococii β-hemolitici se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale.

Identificarea acestor specii se face pe baza caracterelor de cultură şi necesităţilor nutritive menţionate în tabelul 13.

.) Pe geloză-sînge de oaie, la distanţă de striul de stafilococ coloniile de H.influenzae nici nu apar.

Tabelul 13

Principalele caractere pe baza cărora sînt identificate speciile de Haemophilus izolate din infecţii ale omului.

Specia	Cultivarea în Apă peptonată	Apă peptonată cu factor X	V	X+V	Hemoliză*)	Hemaglutinarea**)
H.influenzae	-	-	-	+	-	-
H.haemolyticus	-	-	-	+	+	-
H.parainfluenzae	-	-	+	+	-	-
H.parahaemolyticus	-	-	+	+	+	-
H.aegyptius	-	-	-	+	-	+
H.ducreyi	-	+	-	+	±	-

*) Pe geloză sînge

**) Pe o lamă de microscop se depun alături

- o picătură din soluţia o,5% NaCl în care se face o suspensie densă din cultura bacteriei pe geloză-chocolat;
- o picătură din suspensia o,5% de hematii de om în aceeaşi soluţie salină.

Se amestecă cu ansa cele 2 picături. Dacă tulpina studiată posedă o hemaglutinină, hematiile aglutinează imediat vizibil cu ochiul liber.

Haemophilus aegyptius este căutat şi trebuie identificat în exsudatul conjunctival de la bolnavii cu conjunctivite acute. Identificarea se face pe baza caracterelor menţionate în tabelul 13.

Haemophilus ducreyi este agentul etiologic al şancrului moale.

Frotiul Gram din exsudatul sancrului moale evidenţiază un cocobacil gram-negativ colorat bipolar (aspect de suveică) aşezat izolat sau în lanţuri (aspect de lanţ de bicicletă), intra sau extracelulari.

Cultura. Cultivarea este dificilă. După 48 ore de incubare la 37°C în aerobioză, pe geloză cu 30% sînge de iepure formează colonii mici, S, cenuşii opace, care alunecă înaintea ansei. Diferenţierea de alte specii de hemofili se face pe baza caracterelor menţionate în tabelul 13.

Antibiograma. Hemofilii sînt natural sensibili la antibioticele cu spectru larg. Au fost semnalate tulpini de H.influenzae cu rezistenţă dobîndită. De aceea, antibiograma a devenit necesară pentru antibioterapia acestor infecţii.

In concluzie

Speciile de Haemophilus se identifică pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură şi a necesităţilor nutritive în factor X şi V. Pentru tulpinile infectante antibiograma este necesară.

Genul Bordetella

Genul Bordetella reuneşte agenţii etiologici ai tusei convulsive şi ai unor infecţii respiratorii asemănătoare clinic tusei convulsive, dar mai puţin

grave.

Bordetella pertussis – tuse măgărească

B.pertussis, agentul etiologic al tusei convulsive, este urmărit şi trebuie identificat în exsudatul nazo-faringian al bolnavilor suspecţi de tuse convulsivă şi, de asemenea, în picăturile Flügge eliminate în cursul unui acces de tuse.

Frotiul Gram din produs patologic evidenţiază cocobacili gram-negativi, cu tendinţă la colorare bipolară, capsulaţi şi dispuşi izolat, în perechi şi ocazional în scurte lanţuri.

Cultura. Strict aerob la izolarea din organism cultivă numai pe medii complexe.

Pe mediu Bordet-Gengou*) (agar-infuzie de cartof glicerinată cu 30% sînge) după 72-96 ore la 37°C formează colonii mici, S, bombate, cu luciu caracteristic de picătură de mercur înconjurate cu o zonă de hemoliză.

In subculturi pierde capsula, se degradează antigenic, şi poate cultiva pe medii uzuale.

B.pertussis se diferenţiază de celelalte specii ale genului prin caracterele biochimice şi structura antigenică (vezi tabelul 14).

B.pertussis proaspăt izolată din organism, capsulată, poate fi identificată antigenic prin reacţia

*) Adăugarea la mediu a penicilinei în cantitate de 0,25-0,5 u/ml favorizează izolarea bacteriei prin inhibarea contaminanţilor gram-pozitivi.

de aglutinare pe lamă cu seruri specifice sau prin colorare directă cu anticorpi fluorescenţi.

Tabelul 14

Caractere diferenţiale ale speciilor de *Bordetella*

Caracterul	B.pertussis	B.parapertussis	B.bronchiseptica
Creşterea pe agar peptonă	-	+	+
m.Bordet-Gengou în 1-2 zile	-	+	+
în 3-4 zile	+		
Innegrirea mediului	-	+	-
Mobilitate	-	-	+
Nitrat → nitriţi	-	-	+
Ureaza	-	+	+
Aglutinarea cu ser anti-pertussis poligrup	+	+ sau -	-
Aglutinarea cu ser anti-pertussis grup X	+ sau -	-	-
Aglutinarea cu ser anti-parapertussis grup X	-	+	-
Aglutinarea cu ser anti-bronchiseptica	+ sau -	-	+

B.pertussis în produsele patologice şi în primoculturi conţine antigenul de suprafaţă K, care posedă mai multe fracţiuni; una dominantă (antigenul „major"), specifică, şi altele comune cu alte specii de *Bordetella* (antigene K „minore") Pe baza antigenului K major, *B.pertussis* este înpărţită în 3 grupe antigenice: X (cu 3 serotipuri - 2,3,4), I şi C. De aceea, pentru identificarea antigenică se foloseşte un ser anti-*B.pertussis* poligrup (X,I,C), saturat cu antigenele minore comune altor specii, şi un ser de grup X de asemenea

saturat cu antigenele minore comune.

Bordetella parapertussis şi B.bronchiseptica sînt agenţii etiologici ai unor infecţii respiratorii asemănătoare tusei convulsive dar cu evoluţie mai benignă. Se diferenţiază între ele şi de B.pertussis prin caracterele menţionate în tabelul 14.

Genul Brucella

Genul Brucella cuprinde 3 specii importante care determină infecţii ale caprelor, oilor, vitelor, porcilor ş.a. şi accidental ale oamenilor care vin în contact cu animalele bolnave sau produse provenite de la acestea: B.melitensis, B.abortus, B.suis.

Paraziţi intra-celulari, brucelele invadează pe cale sanguină ţesuturile organismului bolnav. La animalele gestante invadează produsul de concepţie şi-l omoară determinînd avortul - avortul enzootic al animalelor domestice.

La bolnav brucelele sînt izolate cel mai frecvent din sînge. Au mai fost izolate din măduva osoasă, biopsii ganglionare, urină, lcr ş.a. în funcţie de localizarea secundară a leziunilor.

La animalul bolnav brucelele sînt căutate în avorton şi în lapte.

Izolarea brucelelor se face pe medii de cultură. Se poate face şi prin inoculare la cobai (utilă în special pentru izolarea brucelelor din produse cu floră de contaminare). La animalele inoculate (2 pentru fiecare produs) se urmăreşte apariţia anticorpilor anti-Brucella la 3 săptămîni şi 5-6 săptămîni de la inoculare. La 8 săptămîni de la inoculare animalele sînt sacrificate şi se încearcă izolarea brucelelor pe medii de cultură din broiatele de organe (splină, ficat, ganglioni limfatici, rinichi).

Frotiul gram din produs patologic de la bolnav este frecvent negativ.

Cultura

Pe geloză cu infuzie de ficat în aerobioză și atmosferă cu 5-10% bioxid de carbon, la 37°C brucelele formează după 48-96 ore colonii mici, S, transparente. In primoculturi, adaptarea acestor organisme parazite la mediu artificial poate dura 2-4 săptămîni.

Frotiul gram din cultură evidențiază mici cocobacili gram-negativ, uneori polimorfi.

Identificarea genului Brucella se bazează pe următoarele caractere biochimice principale: producerea de urează și absența fermentării zaharurilor*).

Diferențierea celor 3 specii principale de Brucella se face pe baza caracterelor consemnate în tabelul 15.

Tabelul 15

Caractere diferențiale ale speciilor de Brucella

Caracterul	Br.melitensis	Br.abortus	Br.suis
Necesitatea CO_2 la izolare	-	+	-
Producerea de H_2S	-	(numai primele 2 zile)	(timp de 4 zile)
Cultivarea în prezența			
fucsinei bazice	+	+	-
thioninei	+	-	+
Aglutinarea cu ser anti-melitensis	+	-	-
Aglutinarea cu ser anti-abortus	-	+	+

Reacția de aglutinare cu seruri monospecifice permite diferențierea Br.melitensis de Br.abortus și Br.suis, dar nu diferențiază ultimile 2 specii între ele deoarece conțin, în cantități aproximativ egale, un antigen comun (tabelul 15).

*) Cantitățile reduse de acizi rezultate din catabolizarea lentă a zaharurilor de către brucele sînt mascate de amoniacul produs prin dezaminarea aminoacizilor.

Genul Francisella

Francisella tularensis este o bacterie patogenă care în natură determină infecții ale rozătoarelor sălbatece. Accidental infecția este transmisă la om prin contact direct (manipularea animalelor infectate) sau prin artropode hematofage infectate pe animale bolnave.

La omul bolnav, în funcție de forma clinică a bolii, Fr.tularensis este căutată și trebuie identificată în sînge (șanse mai mari de izolare în prima săptămînă de boală), în spută, în exsudatul conjunctival.

Frotiul gram din produs patologic de la bolnav, obișnuit nu evidențiază germenul.

La izolarea din produs patologic de la om sau animal natural infectat, adaptarea pe medii artificiale nu este posibilă fără inocularea prealabilă la șoarece sau cobai.*)

Inocularea (intra-peritoneală sau sub-cutanată) la șoarece sau cobai constituie în același timp metodă de izolare și identificare pentru Fr.tularensis. Soarecii inoculați fac o boală septicemică mortală în 3-6 zile. Germenul se izolează din sîngele cardiac. La necropsie se observă, cu lupa, pe suprafața splinei și ficatului hipertrofiate, noduli necrotici. Amprentele de ficat colorate Giemsa evidențiază macrofage transformate în adevărate pungi pline cu cocobacili. Frotiurile gram din splină, ficat, sînge evidențiază numeroși cocobacili gram-negativi foarte mici.

Cultura se obține numai pe medii speciale îmbogățite, după 2-5 zile de incubare aerobă la 37°C.

Pe mediul Francis (geloză-sînge-cistină-dextroză) formează colonii mici transparente mucoide.

Identificarea se face pe baza spectrului de fermentare al zaharurilor (fermentează fără gaz glucoza, maltoza și manoza) și prin aglutinarea cu ser specific.

./.

*) Manipularea animalelor inoculate se face de către personal vaccinat anti-tularemic.

16 IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIV AEROBI NESPORULAŢI

Corinebacterii aerobe
Listeria
Erysipelothrix

Genul Corynebacterium

Genul Corynebacterium reuneşte bacili gram-pozitivi pleomorfi, frecvent cu extremităţile măciucate şi structură granulară, imobili, nesporulaţi, aşezaţi caracteristic sub formă de litere chinezeşti sau palisade. Unele specii sînt aerobe, altele facultativ anaerobe, iar altele anaerobe (pentru acestea din urmă vezi capitolul 2o, p. 21o).

Specia tip este Corynebacterium diphtheriae care trebuie diferenţiată de bacilii difterimorfi*) (C.pseudodiphthericum şi C.xerosis) care habitează mucoasa respiratorie superioară, mucoasa genitală, conductul auditiv extern.

Corynebacterium diphtheriae

C.diphtheriae este agentul etiologic al toxi-infecţiei difterice. Il urmărim şi trebuie să-l i-

*) Specia C.acnes, care habitează tegumentele, este în prezent inclusă în genul Propionibacterium: Propionibacterium acnes.

dentificăm în exsudatul faringian de la bolnavii cu angină difterică (cea mai frecventă localizare a bolii). Localizările la nivelul plăgilor sînt rare.

Pentru depistarea purtătorilor sănătoşi de bacil difteric se examinează exsudatul nazal şi cel faringian.

Frotiul Gram din produs patologic evidenţiază bacili gram-pozitiv la limită, inegal calibraţi, pleomorfi cu extremităţile măciucate, uneori ramificaţi, dispuşi sub forma literelor chinezeşti.

Frotiul colorat cu albastru de metilen Loeffler evidenţiază mai bine structura granulară a bacilului: bacilii se colorează în albastru iar granulaţiile metacromatice (granulaţiile Babeş-Ernst) se colorează în roz şi sînt dispuse predominant polar.

> Morfotinctorial, între bacilul difteric, bacilii difterimorfi şi actinomycete nu pot fi făcute diferenţieri.

Cultura

(i) Pe mediul Loeffler (bulion glucozat cu ser de bou coagulat) după 12-18 ore de incubare aerobă la 37°C dezvoltă colonii mici opace.

(ii) Pe geloză sînge cu telurit de potasiu (medii selective-diferenţiale) după 24 ore la 37°C formează colonii cenuşii sau negre caracteristice. Aspectul coloniilor pe aceste medii diferă după cele 3 tipuri ale bacilului difteric: gravis, mitis

şi intermedius.) (vezi tabelul 16).

Morfologia se studiază numai în frotiul din cultura pe mediul Loeffler, singura care evidenţiază granulaţiile metacromatice.

Identificarea se continuă cu cercetarea caracterelor biochimice menţionate în tabelul 16 şi testul pentru toxigeneză.

Testul pentru toxigeneză se face in vitro sau in vivo.

Testul in vitro (testul Elek) este un test fidel şi economic (vezi capitolul 6, p. 89).

Testul in vivo

Dintr-o colonie suspectă se însămînţează un tub cu mediu Loeffler şi unul cu bulion infuzie. După 24 ore la 37°C se verifică puritatea culturii prin frotiu de pe mediu Loeffler. Cultura în bulion serveşte pentru testare după 48 ore la 37°C.

(i) Inocularea sub-cutanată la cobai dă cele mai sigure rezultate. Se folosesc 2 cobai. Unul este imunizat prin inocularea intra-peritoneală a 500 U antitoxină difterică cu 2 ore înainte de testare. Apoi la ambii cobai se inoculează sub-cutan 1 ml de cultură.

Dacă tulpina cercetată este toxigenă, cobaiul neprotejat moare în cca 3-4 zile cu semne caracteristice toxiinfecţiei difterice: edem gelatinos-fibrinos la locul de inoculare, lichid sero-sangvinolent în cavităţile seroaselor, hipertrofie, congestie şi hemoragii în supra-renale. Martorul protejat cu antitoxină difterică supravieţuieşte prezentînd

.) Pe mediile selective cu telurit, în afară de bacilul difteric, se mai dezvoltă formînd colonii cenuşii sau negre şi bacilii difterimorfi, enterococii, stafilococii. Pe mediul Tinsdale (mediu selectiv cu telurit dar fără sînge) bacilul difteric formează colonii care se înconjoară cu un halou brun care lipseşte la difterimorfi ş.a. Acest mediu nu diferenţiază cele 3 tupiri ale bacilului difteric.

Tabelul 16

Caractere diferenţiale pentru bacilul difteric şi bacilii difterimorfi

Specia	Morfologia	Aspectul coloniilor pe geloză-sînge cu telurit de potasiu	Hemoliză	Amidon/glicogen	Glucoză	Suroză	Urează	Toxigeneza
C.diphtheriae tip gravis	scurţi, coloraţi uniform	cenuşiu închis mari, plate, uscate, crenelate („floare de margaretă")	-	+	+	-	-	+
C.diphtheriae tip mitis	lungi cu multe granulaţii metacromatice	negre, mici, lucioase, bombate	+	-	+	-	-	+
C.diphtheriae tip intermedius	lungi cu capete măciucate şi granulaţii metacromatice	cenuşii cu centrul negru, acuminate, uscate	-	-	+	-	-	+
C.pseudodiphthericum	scurţi, în palisade, coloraţi uniform	mici, cenuşii cu centrul mai închis, lucioase	-	-	-	-	+	-
C.xerosis	lungi, asemănători b. difteric	mici, negre, lucioase	-	-	+	+	-	-

numai o reacţie inflamatorie minimă la locul de inoculare.

Dacă tulpina este slab toxigenă, cobaiul test slăbeşte progresiv şi la 15-20 de zile de la inoculare prezintă paralizii. La locul de inoculare poate prezenta o escară.

(ii) Inocularea intra-dermică la cobai sau iepure permite testarea mai multor tulpini pe acelaşi animal.

Se epilează flancurile animalului. Zonele epilate se împart în arii de 2 cm lungime. Fiecare cultură de testat se inoculează în volum de o,2 ml în cîte o arie a unui flanc.

După 5 ore*) animalele sînt inoculate cu 5oo u antitoxină difterică (iepurii intra-venos iar cobaii intra-peritoneal)

După 3o min. de la inocularea antitoxinei, se inoculează intra-dermic culturile test, în volum de o,2 ml şi în aceeaşi ordine, în ariile flancului opus. Aceştia vor fi martorii post-antitoxină.

Citirea se face după 24-48 ore. La nivelul de inoculare al tulpinilor toxigene apare o zonă necrotică cu diametrul de 5-1o mm înconjurată cu o arie mai largă de eritem. Martorul corespunzător prezintă cel mult o mică zonă eritematoasă.

Pentru fiecare testare trebuie inclus un martor pozitiv - cultură toxigenă de bacil difteric.

> In concluzie
>
> Bacilul difteric se identifică pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură, biochimice şi a toxigenezei.

---

*) In acest interval seringile încărcate cu culturile de testat sînt menţinute la frigider.

Genul Listeria

Listeria monocytogenes, specia tip a genului, determină în natură infecţii ale animalelor sălbatece sau domestice. Accidental infectează omul.

L.monocytogenes este izolată, şi trebuie identificată, din sînge în formele septicemice ale infecţiei, din lcr în formele meningo-encefalitice ale infecţiei, din lohii, placentă în infecţii intrauterine urmate de avort sau naştere de făt mort. La necropsie se încearcă izolarea din organe (creier, ficat, splină).

Frotiul Gram din produs patologic evidenţiază un bacil fin gram-pozitiv, izolat sau în scurte lanţuri, intra sau extracelular.

Cultura

(i) Pe geloză-sînge după 24 ore la 37°C dezvoltă, la izolarea [illegible] organism, colonii S, de mărime mijlocie, β-hemo[illegible]ice. Frotiul Gram evită confuzia cu streptococii [illegible]emolitici.

La 4°C cult[illegible] apare după 4-7 zile de incubare (bacterie psichro[illegible]rophă)*)

(ii) Cultivă pe medii cu telurit de potasiu formînd după 48 ore la 37°C colonii asemănătoare cu

---

*) Dacă prima tentativă de izolare nu reuşeşte (cazul produselor cu floră de contaminare, îndeosebi), produsul patologic se menţine, suspensionat în bulion, la 4°C urmînd a se repeta periodic tentativa de izolare. In aceste condiţii, flora de contaminare este inhibată şi se realizează o veritabilă îmbogăţire a produsului cu L.monocytogenes.

ale bacililor difterimorfi.

Pentru identificare se cercetează mobilitatea şi patogenitatea pentru iepure.

Mobilitatea se cercetează pe culturile incubate la 22-26°C. Se face un examen între lamă şi lamelă a culturii în bulion glucozat sau se face o însămînţare prin înţepare profundă în coloană de geloză moale.

Testul de patogenitate. Iepurii inoculaţi în sacul conjunctival cu cultura de 24 ore, proaspăt izolată, fac o cherato-conjunctivită purulentă. Unele animale se vindecă spontan după 6-7 zile; altele mor prin meningo-encefalită.

Identificarea definitivă se face pe baza caracterelor biochimice şi antigenice.

Genul Erysipelothrix

E.rhusiopathiae (bacilul rujetului) este agentul etiologic al erizipelului porcului. In natură determină infecţii şi la alte diverse specii animale (şoareci, păsări ş.a.) La om infecţia apare cu precădere la lucrătorii din abatoare, măcelari. Se manifestă ca o dermită asemănătoare clinic erizipelului, localizată cu precădere la mîini.

E.rhusiopathiae poate fi izolat din biopsie cutanată şi din sînge în formele septicemice. Inocularea intra-peritoneal la şoarece a suspensiei de material bioptic măreşte şansele de izolare; cultura pură este obţinută în 24 ore din sîngele cardiac.

Cultura

La izolarea din organism formează pe geloză-sînge, după incubare aerobă*) peste noapte la 37°C, colonii mici,

*) E.rhuziopathiae este microaerofil dar poate cultiva atît în aerobioză cît şi în anaerobioză.

S (β-hemolitice pe mediile cu 10% sînge de cal).

Frotiul Gram arată un bacil fin gram-pozitiv. Spre deosebire de L.monocytogenes, este imobil şi inoculat în sacul conjunctival la iepure determină numai o conjunctivită benignă fără cheratită.

./.

17 IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIVI SPORULATI AEROBI

Bacillus anthracis
Bacilii antracoizi

Toţi bacilii gram-pozitivi sporulaţi aerobi sînt incluşi în genul *Bacillus*, care conţine numeroase specii. Majoritatea acestora sînt lipsite de patogenitate pentru om sau se comportă, mai rar, ca microorganisme cu patogenitate condiţionată (*B.cereus*, *B.subtilis* ş.a.) Saprofiţi ai solului, au o largă răspîndire în natură putînd contamina tegumentele sau mucoasele omului. Deoarece morfo-tinctorial se aseamănă cu specia patogenă a genului, *B.anthracis*, sînt desemnaţi sub denumirea de bacili antracoizi.

> Importanţa practică a cunoaşterii bacililor antracoizi este îndeosebi de a-i diferenţia de singura specie redutabil patogenă, *B.anthracis*, şi de a-i recunoaşte ca posibili contaminanţi ai unor produse normale sau patologice recoltate de la om.

B.anthracis este agentul etiologic al antraxului la om şi animale. Boala, relativ rară la om, îmbracă mai ales un aspect profesional evoluînd fie sub forma pustulei maligne sau edemului malign (cărbune extern sau cutanat) fie, mult mai rar şi de o

gravitate extremă, ca o bronho-pneumonie sau enterită cărbunoasă. Toate cele 3 localizări pot determina generalizare: septicemică.

B.anthracis, la omul bolnav, poate fi cercetat, în funcţie de localizare, în produsele recoltate de la nivelul leziunii cutanate, spută, materii fecale, sînge, lichid cefalo-rahidian.

Frotiul colorat Gram din produse patologice pune în evidenţă bacili gram-pozitivi cu extremităţi tăiate drept, izolaţi sau în lanţuri scurte (2-3 bacili), înconjuraţi de o capsulă a cărei prezenţă poate fi mai uşor marcată după coloraţia metacromatică cu albastru de metilen.

Prezenţa capsulei diferenţiază B.anthracis de toţi bacilii antracoizi.

Sporul sferic sau ovoid, dispus central sau paracentral, fără să deformeze semnificativ forma bacilului, nu apare decît în frotiul din cultură unde şi bacilii au o dispoziţie predominant în lanţuri (fig.49).

Cultura se dezvoltă după 18-24 ore în condiţii de aerobioză la 37°C chiar pe mediile de bază: bulion şi geloză nutritivă.

Pe geloză-sînge, mediu recomandat pentru izolarea B.anthracis din produse patologice, cultivă sub formă de colonii mari, rotunde, cu margini neregulate, opace, uscate şi mate (de tip R), invariabil

nehemolitice.

Sporularea culturilor este favorizată de prezenţa o-xigenului şi temperaturi mai joase (20-30°C) fiind inhibată la peste 42°C.

Capsula este sintetizată numai pe medii bogate în albumine sau bicarbonatate şi în atmosferă cu bioxid de carbon.

Studierea unor caractere biochimice este importantă pentru diferenţierea *in vitro* a

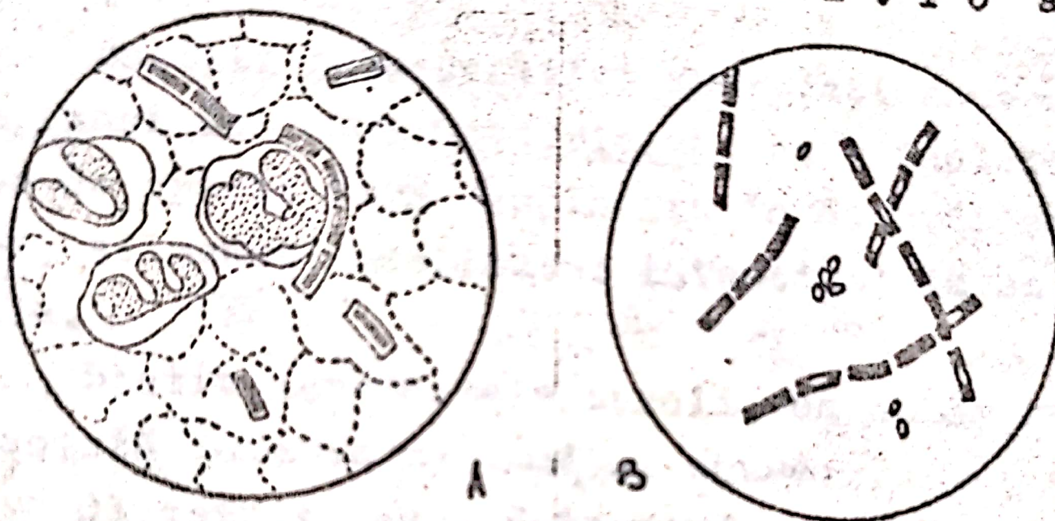


Fig.49 Bacillus anthracis. A-frotiu din produs patologic; B-frotiu din cultură.

B.anthracis de bacilii antracoizi şi în special de B.cereus (tabelul 17).

Caracterul diferenţial major între B.anthracis şi bacilii antracoizi este patogenitatea pentru animalele de laborator.

Un mare număr de specii animale sînt sensibile la infecţia cărbunoasă experimentală. Cei mai utilizaţi sînt şoarecii. Cultura spălată a microorganis-

Tabelul 17

Caractere diferenţiale între B.anthracis şi B.cereus

Caracterul	B.anthracis	B.cereus
Mobilitate	-	+
Hemoliză β pe geloză-sînge	-	+
Lichefierea gelatinei	- (sau f.lentă)	+
Lecitinaza	- (sau slab pozitivă)	+
Fag gamma	sensibil	rezistent
Penicilină G 10 u/ml	sensibil	rezistent
Patogenitatea pentru animal	+	-

mului de testat*) este inoculată sub-cutanat sau intraperitoneal. B.anthracis determină o infecţie septicemică mortală în 2-5 zile, bacteria putînd fi uşor evidenţiată în sînge (hemocultură) şi pe amprente de organ (splină, ficat ş.a.)

Antibiograma. B.anthracis este sensibil la antibioticele active asupra bacteriilor gram-pozitive. Deoarece s-au semnalat tulpini cu rezistenţă dobîndită, antibiograma a devenit necesară şi pentru tratamentul antimicrobian al antraxului.

B.cereus este natural rezistent la penicilină.

*) B.cereus poate produce în mediul de cultură produşi toxici de metabolism care pot cauza moartea animalelor inoculate.

18 IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIVI SPORULATI ANAEROBI

Clostridium tetani

Clostridium botulinum

Clostridiile gangrenei gazoase

Bacilii gram-pozitivi sporulaţi anaerobi sînt cuprinşi în genul Clostridium, care include peste 300 de specii larg răspîndite în natură: sol, praf, apă, alimente, conţinutul intestinal la om şi animale.

Dintre numeroasele specii, un număr redus prezintă interes medical şi anume:

Cl.tetani, care determină toxiinfecţia tetanică;

Cl.botulinum, care cauzează intoxicaţia botulinică şi

Cl.perfringens, Cl.sordellii, Cl.septicum, Cl.novyi, Cl.histolyticum ş.a. care în variate asociaţii reprezintă agenţii etiologici ai gangrenei gazoase.

> Identificarea acestor specii se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale (prezenţa caracteristică a sporilor), de cultivare (anaerobi), biochimice, a toxinelor elaborate sau prin testul de patogenitate pentru animal.

Frotiul din cultură pune în evidenţă bacili gram-pozitivi, cu extremităţi rotunjite, sporulaţi. Sporul, deobicei ovalar, depăşeşte diametrul transversal al bacilului; are dispoziţie subterminală sau centrală; excepţie face Cl.tetani la care sporul este sferic, terminal (fig.5o).

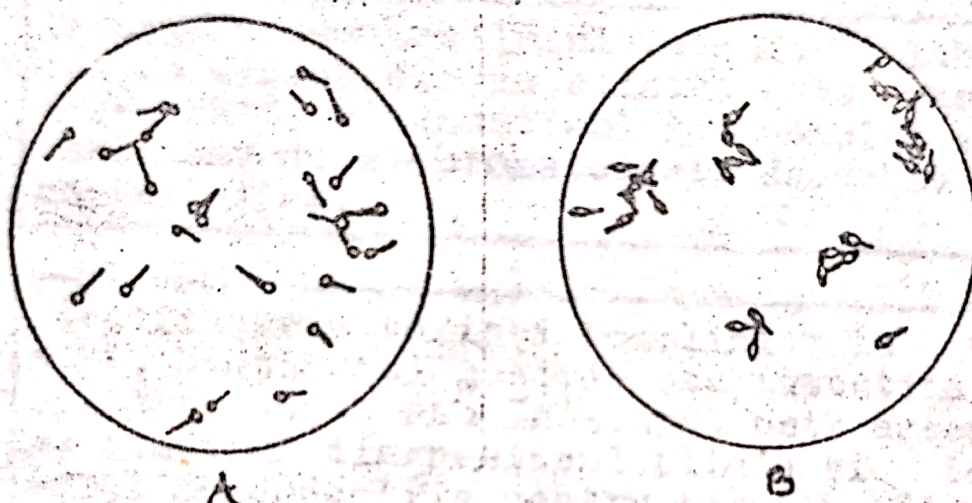


Fig.5o Frotiu din cultură de Cl.tetani (A) şi Cl.botulinum (B)

In frotiul din produse patologice sporul poate lipsi; Cl.perfringens se poate prezenta capsulat.

Cultura se obţine numai în condiţii anaerobe (vezi capitolul 3, p.58) după 18-24 ore de incubare la 37°C.

In geloză moale dau colonii pufoase, unele invadante, în afară de Cl.perfringens, singura specie imobilă, şi variantele aciliate ale speciilor mobile care cultivă sub formă de colonii lenticulare.

Aspectul coloniilor pe geloză sînge este variabil, mai distincte fiind coloniile de Cl.perfringens

care formează o zonă dublă de hemoliză: o zonă clară de hemoliză imediat în vecinătatea coloniei şi o altă zonă de hemoliză incompletă la periferie (hemoliza este absentă pe geloză cu sînge de cal).

Bulionul VF este tulburat intens cu degajarea de bule de gaz şi miros fetid.

Identificarea biochimică se bazează îndeosebi pe spectrul fermentativ al zaharurilor şi prezenţa sau absenţa activităţii proteolitice a tulpinii.

Identificarea tipului de exotoxină sau a unor exoenzime elaborate reprezintă testul major de identificare.

Clostridium perfringens poate fi uşor identificat prin testul Nagler care evidenţiază neutralizarea specifică prin antitoxină a efectului lecitinazei (α-toxina) după însămînţarea tulpinii pe un mediu cu gălbenuş de ou.

Toxina tetanică precum şi tipurile de toxină botulinică (cu importanţă pentru om tipurile A, B şi E) sau cele elaborate de Cl.perfringens (A şi C) pot fi identificate pe baza testelor de seroneutralizare pe şoarece. Supernatantul centrifugatului de cultură*) se inoculează intra-peritoneal la şoarece: ca atare (la lotul martor) sau după amestec prealabil în proporţie 4:1 cu ser antitoxic polivalent sau de tip. Se urmăresc animalele, în medie 5 zile. Lotul martor şi loturile la care serul antitoxic nu a asigurat protecţia prezintă paralizii şi în final animalele mor. Toxina este identificată de serul care a asigurat neutralizarea

*) Pentru toxina tetanică se lucrează şi cu diluţii de cultură.

sa.

Pentru agenţii etiologici ai gangrenei gazoase se poate studia patogenitatea integrală a tulpinii (virulenţa + toxigeneza), folosindu-se inocularea culturii intramuscular la cobai. La animalele decedate se urmăresc atît aspectul culturii cît şi eventualele epanşamente serosanguinolente de la nivelul cavităţilor seroaselor. In leziunea locală şi uneori la nivelul organelor poate fi pus în evidenţă, prin frotiuri şi cultură, agentul infectant.

Identificarea bacilului tetanic în laboratorul de microbiologie clinică este rareori necesară•): diagnosticul tetanosului este favorizat de simptomatologia deosebit de caracteristică.

Identificarea toxinei botulinice în vărsături, conţinutul gastric sau intestinal aspirat cu sonda sau în sînge, este aceea care confirmă diagnosticul clinic şi indică serul monospecific pentru terapie. Identificarea bacilului botulinic nu constituie un scop pentru laboratorul de microbiologie clinică.

Izolarea şi identificarea clostridiilor gangrenei gazoase este necesară pentru stabilirea agentului sau agenţilor infectanţi şi dă indicaţii privind terapia cu seruri specifice. Rezultatul laboratorului, uneori destul de tardiv, face ca terapia cu ser polivalent antigangrenos să fie instituită în orice suspiciune clinică de infecţie cu aceste bacterii.

•) Se pune problema numai în tetanosul noului născut, postabortiv sau postoperator, cînd apar aspecte medico-judiciare.

19 **IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-NEGATIV ANAEROBI**

Bacilii gram-negativi anaerobi fac parte din aşa numita floră Veillon (care include toţi anaerobii nesporulaţi), prezentă pe tegument şi pe mucoasele intestinală, uro-genitală, bucală şi a căilor respiratorii superioare. Bacilii gram-negativ anaerobi reprezintă cea mai importantă componentă a florei normale a acestor mucoase.

In anumite condiţii pot determina variate infecţii localizate sau generalizate în asociaţie cu alţi anaerobi sau cu variate specii facultativ anaerobe. Se apreciază că aceşti bacili sînt prezenţi în mai mult de jumătate din produsele patologice din care se izolează floră anaerobă.)

Bacilii gram-negativi anaerobi cu interes pentru patologia infecţioasă sînt grupaţi în 3 genuri

- Bacteroides,
- Fusobacterium,
- Leptotrichia

fiecare gen cuprinzînd numeroase specii.

Frotiul gram din produse patologice poate pune în evidenţă bacili gram-negativi drepţi sau uşor în-

---

.) Una din speciile cel mai frecvent întîlnite este Bacteroides fragilis.

curbaţi, cu extremităţi rotunjite sau efilate, uneori forme filamentoase ce prezintă umflături terminale sau centrale alături de formaţiuni sferice libere. Aspectele descrise nu caracterizează în mod deosebit speciile unui anumit gen.

Cultura

Cultivarea exclusiv în anaerobioză este un test major de identificare a acestor bacterii.

Pe geloză-sînge, în anaerobioză, după 24-48 ore la 37°C formează colonii mici, S, translucide sau semiopace, eventual înconjurate cu o zonă de hemoliză. Bacteroides melaninogenicus apare sub formă de colonii pigmentate în brun-negru, pigmentare care se intensifică prin prelungirea incubării.

Puţine specii necesită pentru cultivare medii cu sînge lacat şi cu adaus de menadion (vitamina K) sau vitamine din complexul B.

Bacteroides fragilis se dezvoltă mai bine pe medii cu 20% bilă.

Criteriile utilizate în identificarea ca specie a bacililor gram-negativi anaerobi includ pe lîngă aspectele morfo-tinctoriale şi de cultură şi rezultatele numeroaselor teste biochimice şi analiza cromatografică a produşilor rezultaţi din fermentarea glucozei. Această identificare este deosebit de laborioasă şi uneori depăşeşte chiar posibilităţile unor laboratoare cu profil.

Laboratorul de microbiologie clinică îşi propune numai încadrarea într-un grup sau cel mult gen a bacteriilor izolate. Mult mai importantă este demonstrarea implicării lor etiologice şi testarea sensibilităţii la antibiotice.

Efectuarea antibiogramei pentru bacilii gram-negativi anaerobi se impune întrucît spectrul de sensibilitate variază chiar de la tulpină la tulpină. De menţionat, necesitatea includerii în trusa de testare şi a rondelelor de penicilină, unii din bacilii gram-negativi anaerobi fiind sensibili la acest valoros antibiotic.

Rezistenţa selectivă a unor specii anaerobe gram-negative faţă de unele antibiotice (neomicină, kanamicină, vancomicină, paromomicină) este folosită pentru prepararea de medii selective pentru izolare.

./.

20 IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIVI NESPORULAȚI ANAEROBI

Bacilii gram-pozitiv nesporulați anaerobi fac parte din flora Veillon fiind întîlniți pe tegumente și pe mucoase. Speciile cu interes pentru patologia infecțioasă sînt grupate în 3 genuri (tabelul 18), fiecare gen cuprinzînd numeroase specii.

Factori care influențează defavorabil apărarea antiinfecțioasă locală sau generală a organismului fac ca aceste bacterii să-și manifeste potențialul de patogenitate. Incidența lor în variate infecții localizate sau generalizate este însă mai mică comparativ cu a bacililor gram-negativi anaerobi (cca 1/3 din cazuri).

Cei mai frecvent semnalați sînt bacilii incluși în genurile Eubacterium (în orice produs patologic) și Propionibacterium (în general în toate produsele, mai rar în cele care provin din sfera uro-genitală). Urmează apoi reprezentanții genului Actinomyces, A.israelii fiind una din speciile cele mai cunoscute din cauza unei entități clinice pe care o provoacă: actinomicoza cervico-facială.

De menționat este apariția lor posibilă ca contaminanți ai unor produse normal sterile*).

---

*) Îndeosebi Propionibacterium acnes, prezent pe tegumente și care poate contamina frecvent hemoculturile în anaerobioză.

Tabelul 18

Principalele genuri care includ bacili gram-pozitivi nesporulaţi anaerobi cu interes pentru patologia infecţioasă.

Subgrupe morfologice	Genuri
I. Bacili drepţi sau uşor încurbaţi, dispuşi izolat, în perechi sau în lanţuri	Eubacterium
II. Bacili care pot prezenta ramificaţii şi care sînt aşezaţi în perechi, palisade sau litere unghiulare	Propionibacterium*) Actinomyces*)

*) Cuprind specii preferenţial anaerobe, unele facultativ anaerobe.

Identificarea ca specie a bacililor gram-pozitivi nesporulaţi anaerobi se face pe baza aceloraşi grupe de caractere ca şi în cazul bacililor gram-negativi anaerobi (vezi capitolul [illegible]) şi nu constituie un scop important pentru laboratorul de microbiologie clinică, care trebuie însă să aducă argumentele pentru implicarea etiologică a acestor izolaţi indiferent de numele pe care îl poartă.

Studiile privind testarea la antibiotice a bacililor gram-pozitivi nesporulaţi anaerobi indică sensibilitatea quasiconstantă a acestora faţă de penicilină, clindamicină, lincomicină şi rifampicină.

Pentru clinician este utilă indicarea prezenței în produsul patologic a unor bacili gram-pozitivi nesporulați anaerobi și implicarea lor etiologică; infecțiile cauzate exclusiv de specii din acest grup sînt influențate favorabil de terapia cu penicilină.

21 IDENTIFICAREA BACILILOR ACIDO-ALCOOLO-REZISTENTI

Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium bovis
Mycobacterium avium
Mycobacterium leprae
Micobacterii saprofite şi condiţionat patogene

Bacilii acido-alcoolo-rezistenţi aparţin genului Mycobacterium.

Genul include numeroase specii care pot fi divizate în 2 mari grupe:

(1) Specii necultivabile pe medii artificiale: M.leprae, agentul etiologic al leprei umane.

(2) Specii cultivabile pe medii artificiale, cu creştere lentă sau rapidă.

(i) Patogene pentru om şi animale cu sînge cald:

- M.tuberculosis, agentul etiologic al tuberculozei umane,
- M.bovis, agentul etiologic al tuberculozei bovine,
- M.avium, agentul etiologic al tuberculozei aviare.

Patogenitatea nu este strictă pentru o anumită specie animală, M.bovis şi M.avium pot cauza uneori

îmbolnăviri şi la om.

(ii) Saprofite ale mediului înconjurător, care se comportă faţă de om ca accidental sau condiţionat patogene: M.kansasii, M.intracellulare, M.scrofulaceum, M.marinum, M.fortuitum ş.a.

Afecţiunile pe care le determină se aseamănă, clinic şi radiologic, cu tuberculoza fiind cunoscute sub numele de micobacterioze. Individualizarea acestor afecţiuni este importantă din punct de vedere al conduitei terapeutice.

(iii) Saprofite ale mediului extern, unele prezente pe mucoasele omului şi animalelor, nepatogene. Contaminează ocazional probele de urină şi suc gastric: M.smegmatis, M.gastri ş.a.

Mycobacterium tuberculosis

M.tuberculosis, faţă de restul micobacteriilor, determină mai mult de 90% din îmbolnăvirile la om. Reprezintă principalul agent etiologic al tuberculozei umane. Cea mai frecventă localizare o constituie pulmonul dar există şi variate localizări extrapulmonare: meningita tuberculoasă, tuberculoza renală, genitală, articulară, osoasă, ganglionară, cutanată, intestinală ş.a.

Diagnosticul de tuberculoză pulmonară sau extrapulmonară se face prin punerea în evidenţă a M.tuberculosis - prin examen microscopic, cultură, sau inoculare la cobai - în produsele recoltate de

la bolnav. Acestea variază în funcţie de localizarea procesului tuberculos: spută, spălătură gastrică, lcr, urina, sînge menstrual, lichid articular sau alte epanşamente seroase, biopsii, materii fecale.

Frotiul colorat Ziehl-Neelsen efectuat din porţiunile purulente ale sputei sau din sedimentul unor produse concentrate prin centrifugare pune în evidenţă prezenţa de bacili acido-alcoolo-rezistenţi subţiri, drepţi sau uşor încurbaţi, dispuşi izolat sau grupaţi sub forma unor litere unghiulare.

Acido-alcoolo-rezistenţa este o proprietate tinctorială care diferenţiază micobacteriile de restul microorganismelor.

Morfo-tinctorial, între micobacterii nu pot fi făcute diferenţieri, indiferent de caracterul lor patogen sau saprofit-oportunist.

Evidenţierea de bacili acido-alcoolo-rezistenţi în produsele normal sterile cît şi în spută echivalează cu desemnarea agentului infectant.

Semnificaţia prezenţei de bacili acido-alcoolo-rezistenţi în urină şi produsul de spălătură gastrică va fi stabilită numai după identificarea prin cultură a tulpinii izolate.

Cultura se dezvoltă după minimum 14 zile (fiind obligaţi a o urmări pînă la 8 săptămîni), în aerobioză, la 37°C, numai pe medii speciale. Pentru izolare, cel mai larg folosit este mediul Löwenstein-Jensen pe care M.tuberculosis cultivă sub forma de colonii R, eugonice, cu aspect conopidiform avînd o tentă alb-gălbuie.

Izolarea M.tuberculosis din produsele contaminate impune în prealabil eliminarea florei de asociaţie. Diferitele procedee de decontaminare preconizate se bazează pe rezistenţa mult mai mare a bacililor acido-alcoolo-rezistenţi la acţiunea unor agenţi chimici: acizi, baze, detergenţi, enzime, unele antibiotice, graţie structurii chimice particulare a peretelui celular, deosebit de bogat în lipide.

Procedeul de decontaminare folosit la noi în ţară utilizează o soluţie NaOH 4% care se adaugă în volum egal sau dublu la produsul de cercetat (în funcţie de abundenţa florei de asociaţie). Se agită amestecul 2-3 minute şi apoi se menţine la 37°C timp de 30 min. Se neutralizează cu sol.15% fosfat monopotasic, în prezenţa albastrului de brom-timol pînă la virarea culorii în galben-verzui.

Cultura ne furnizează date importante privind identificarea tulpinii izolate. In acest scop sînt urmărite:

- aspectul coloniilor: R, S sau R-S, eugonice sau disgonice;
- viteza de creştere: micobacterii cu creşte-

re rapidă (primocultura apare înainte de 7 zile) și cu creștere lentă (peste 7 zile);

- pigmentogeneza: tulpini fotocromogene (colonia se pigmentează în galben numai după expunere la lumină), scotocromogene (pigmentul galben-portocaliu se dezvoltă la întuneric) și necromogene;

- temperatura de cultivare: 24°C, 32°C, 37°C, 45°C.

Studierea caracterelor biochimice

Testul Konno pozitiv (producere de acid nicotinic în cantitate mare) permite diferențierea M.tuberculosis de toate celelalte micobacterii. Studierea altor caractere biochimice care realizează identificarea ca specie a celorlalte micobacterii, prin volumul mare de lucru pe care îl reclamă, rămîne de competența laboratoarelor de referință.

Patogenitatea pentru animalele de laborator variază în funcție de numărul și gradul de virulență al bacililor inoculați cît și de receptivitatea de specie a animalelor inoculate și calea de inoculare.

Inocularea la animal servește pentru 2 scopuri majore: ca metodă de izolare din produse patologice sau ca metodă de identificare (tabelul 2o).

Pentru izolare, cel mai utilizat este cobaiul. Receptivitatea deosebită a acestuia la infecția tuberculoasă face ca inocularea sub-cutanată (a pro-

duselor contaminate) sau intra-peritoneal (a produselor normal sterile) să reprezinte metoda cea mai sensibilă de diagnostic bacteriologic.

Produsele provenite din leziunile de tuberculoză extrapulmonară, care sînt cel mai frecvent paucibacilare, vor fi obligator inoculate la cobai.

Animalul moare în 6 săptămîni - 3 luni cu leziuni cazeoase splenice, hepatice şi, mai tardiv, pulmonare, eventual cu şancru de inoculare şi adenopatie satelită. Frotiurile din leziuni şi cultura confirmă diagnosticul.

Tabelul 2o

Rezultatele inoculării tulpinilor de micobacterii la animalele de laborator în scop de identificare

Specia	Cobai s.c. o.1 mg	Iepure i.v. o.o1 mg	Soarece i.v. o.o1 mg	Găină i.v.1 mg
M.tuberculosis	+•)	-	+	-
M.bovis	+•)	+•)	+	-
M.avium	-	+	+	+
Alte specii	-	-	+ sau -	-

•) Fac excepţie tulpinile HIN rezistente şi cele izolate din leziuni lupice.

Antibiograma

Intrucît tulpini de M.tuberculosis şi M.bovis manifestă cu o frecvenţă sporită rezistenţă dobîndită faţă de unele tuberculostatice majore, practicarea antibiogramei pentru micobacteria infectantă este obligatorie.

Antibiograma se mai impune şi pentru motivul că celelalte specii au în general o rezistenţă naturală faţă de streptomicină şi HIN şi variabilă, în funcţie de tulpină, faţă de restul tuberculostaticelor.

Antibiograma poate servi şi în scop de identificare: hidrazida acidului tiofen- 2 carboxilic şi pirazinamida diferenţiază M.tuberculosis de M.bovis

Din cauza creşterii lente a majorităţii micobacteriilor, antibiograma se execută cu antibioticele şi chimioterapicele incorporate în mediu în concentraţii absolute.

Mycobacterium leprae

M.leprae, agentul etiologic al leprei umane, se prezintă, în frotiurile din produsele de scarificaţie tegumentară sau de la nivelul mucoasei septului nazal, sub formă de bacili acido-alcoolo-rezistenţi drepţi sau uşor încurbaţi, izolaţi sau grupaţi. Deosebit de caracteristică este dispoziţia lor paralelă în interiorul mononuclearelor (globi).

Nu cultivă pe medii artificiale. Izolarea din leproame a reuşit numai prin inoculare intraplantară la şoarece.

Borelia < recurrentis
duttoni
vincenti
bucalis
refringens

Borrelia
Treponema
Leptospira

Genul Borrelia

Unele specii sînt patogene pentru om şi animale la care determină febrele recurente transmise de păduchi (B.recurrentis ş.a.) sau căpuşe (B.duttoni ş.a.)

La bolnav prezenţa boreliilor este urmărită în sîngele recoltat în cursul acceselor febrile ale bolii.

Frotiul de sînge colorat Giemsa evidenţiază microorganisme filamentoase de 1o-2o µ lungime, subţiri cu 5-7 spire largi neregulate.

Examenul plasmei în preparat umed pe fond negru (vezi capitolul 2, p.44) evidenţiază în plus mobilitatea germenului (fig.51).

Dacă aceste examene rămîn negative, proba de sînge de la bolnav se inoculează intra-peritoneal la şobolani de 3-5 zile. Probe de sînge din coada animalelor sînt examinate zilnic prin frotiu colorat sau pe fond negru pentru evidenţierea boreliilor.

Alte specii sînt comensale oportuniste ale cavităţii bucale (B.vincenti, B.buccalis) sau genitale (B.refringens). La pacienţi cu apărarea antiinfecţioasă deficitară B.vincenti în asociaţie cu Fusobacterium fusiforme poate determina leziuni ulcero-necrotice: angina Vincent, stomatite.

Frotiul gram din exsudatul leziunilor ulcero-necrotice evidenţiază numeroase microorganisme filamentoase cu spire largi, neregulate şi bacili gram-negativi fuziformi (vezi şi capitolul 30, p. 309).

Genul Treponema

Treponemele patogene - Tr.pallidum (agentul etiologic al sifilisului), Tr.pertenue (agentul etiologic al pianului) şi Tr.carateum (agentul etiologic al pintei) - nu cultivă i n v i t r o şi sînt similare morfologic.

Treponema pallidum este căutată în serozitatea din şancrul sifilitic şi din ganglionii limfatici sateliţi acestei leziuni.

Pentru recoltarea probei mîinile sînt protejate cu mănuşi chirurgicale de cauciuc. Se spală leziunea cu ser fiziologic steril folosind o compresă de tifon. Dacă există crustă se îndepărtează după înmuierea ei.

Se gratează uşor marginea şancrului (nu trebu-

ie să sîngereze) și se exprimă ușor între degete baza șancrului pentru a obține o picătură de serozitate.

Se atinge picătura cu o lamă de microscop, se montează preparatul umed și se examinează la microscopul cu fond negru.

Examenul microscopic pe fond negru al serozității din șancru poate evidenția Tr.pallidum care apare ca un organism filamentos de 6-20 μ lungime, subțire, cu 6-18 spire adînci, regulate și cu capetele efilate. Mobilă, prezintă grațioase mișcări de flexie și de translație lentă.

In serozitatea șancrelor din regiunea ano-genitală, mai ales la femeie, și a celor bucale, Tr.pallidum trebuie diferențiată de treponemele și boreliile comensale contaminante. Acestea sînt mai lungi și mai groase sau au spire neregulate. Examenul serozității din ganglionii sateliți evită aceste dificultăți: proba nu este contaminată.

Colorarea directă cu anticorpi fluorescenți a frotiurilor din serozitatea leziunilor sifilitice primare poate evidenția de asemenea Tr.pallidum. In acest caz colorarea și examinarea frotiului pot fi temporizate.

Genul Leptospira

Leptospirele patogene sînt reunite în specia Leptospira interrogans iar cele saprofite în spe-

cia Leptospira biflexa. Există 125 serotipuri de leptospire patogene cuprinse în 18 serogrupe (tabelul 21).

Tabelul 21

Lista serogrupelor de leptospire (O.M.S., 1967)

1. L.icterohaemorrhagiae	10. L.australis
2. L.javanica	11. L.pomona
3. L.celledoni	12. L.hebdomadis
4. L.canicola	13. L.bataviae
5. L.ballum	14. L.tarassovi
6. L.pyrogenes	15. L.panama
7. L.cynopteri	16. L.shermani
8. L.autumnalis	17. L.semaranga
9. L.grippotyphosa	18. L.andamana

La bolnavul cu leptospiroză leptospirele se urmăresc în sînge în prima săptămînă de boală, în urină din a 2-a săptămînă de boală, în lcr la bolnavii cu reacţii meningeale; în ficat, pulmoni, rinichi la cadavre.

Examenul microscopic pe fond negru al preparatului umed (plasmă de la animalele inoculate experimental•), urină, culturi) evidenţiază un microorganism mobil, filamentos, lung de 15-20 μ şi subţire. Spirele sînt puţin adînci, foarte strînse şi regulate (aspect de frînghie răsucită) iar extremităţile în cîrlig (fig.51).

•) Pe plasma pacienţilor cu leptospiroză, acest examen nu dă rezultate satisfăcătoare din cauza artefactelor.

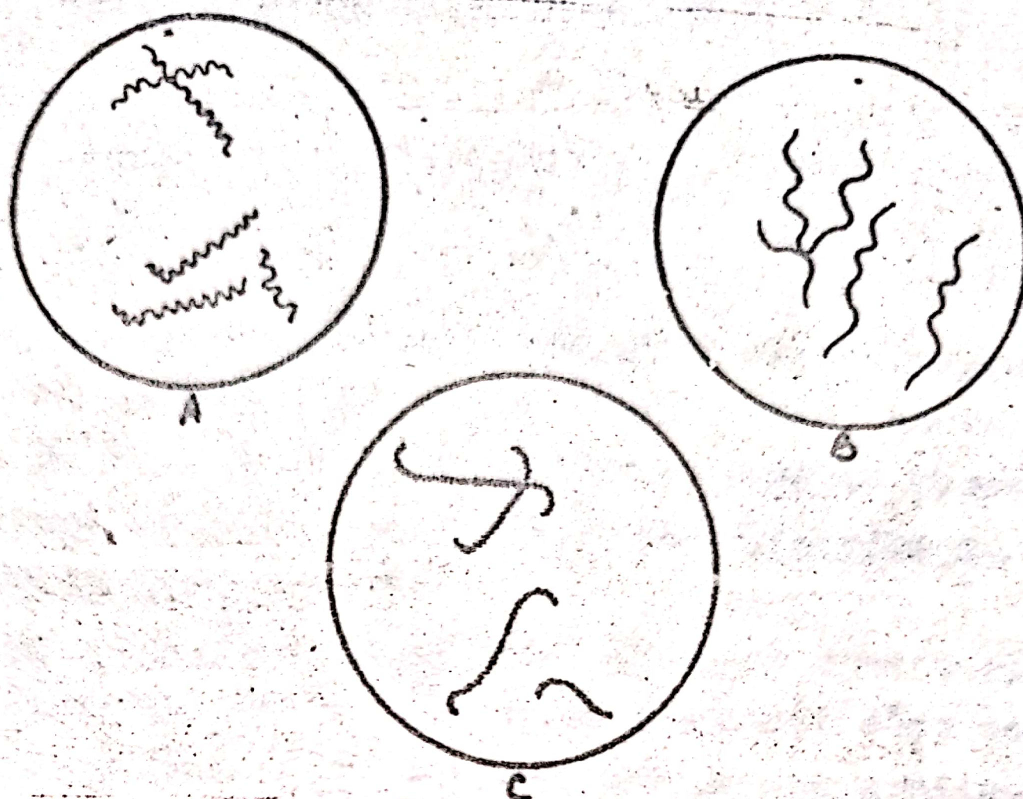


Fig.51 Aspectul microscopic al spirochetelor (schematic): A-Treponema pallidum, B-Borrelia C-Leptospira

Morfologic, variatele sérotipuri de leptospire patogene nu se diferenţiază între ele; nici leptospirele patogene de cele nepatogene.

Cultura

Leptospirele cultivă în aerobioză la 28°C şi întuneric în medii care în esenţă constau dintr-o soluţie salină tamponată la pH 7,2-7,4 şi îmbogăţită cu ser de iepure, peptonă sau infuzie de carne. In aceste condiţii, cultura apare în 1-2 săptămîni. Nu este vizibilă cu ochiul liber. Se evidenţiază prin examen microscopic pe fond negru al preparatului umed.

Izolarea pe medii de cultură în paralel cu inocularea la cobai sînt principalele metode de evidenţiere a leptospirelor la bolnav.

Leptospirele patogene inoculate la cobai determină o boală febrilă*) cu pierdere în greutate.

In cazul leptospirelor foarte virulente incubaţia bolii experimentale este de 2-5 zile şi către a 4-13-a zi de la inoculare survine moartea animalului precedată, obişnuit, de apariţia icterului.

In cazul leptospirelor mai puţin patogene incubaţia este mai lungă.

In momentul în care animalele prezintă febră şi încep să scadă în greutate sînt sacrificate. Animalele inoculate cu tulpini virulente prezintă seroasele icterice şi numeroase hemoragii cutanate, subcutanate şi musculare. Ficatul, rinichii şi pulmonul sînt congestivi şi hemoragici. Leptospirele sînt căutate în sîngele cardiac, exsudatul peritoneal, omogenatele de ficat şi splină prin examen microscopic pe fond negru şi însămînţare pe medii de cultură.

Identificarea serotipurilor de Leptospira se face prin reacţii de aglutinare-liză cu seruri de referinţă. Reacţiile se fac pe lamă şi se citesc în preparat umed la microscopul cu fond negru.

---

*) Temperatura normală a cobaiului este de 38-39,5°C

23 IDENTIFICAREA MICOPLASMELOR

Micoplasmele sînt cele mai mici microorganisme capabile să trăiască pe medii artificiale, deosebindu-se de restul bacteriilor prin absența peretelui celular. Sînt încadrate în genul Mycoplasma, familia Mycoplasmataceae.

Mycoplasma pneumoniae este singura specie potențial patogenă pentru om; alte 5 specii sînt considerate comensale ale mucoasei orale sau genito-urinare (M.orale, M.salivarium, M.hominis, M.fermentans, Mycoplasma T). Unele studii recente atestă potențialul patogen al tulpinilor de M.hominis prin izolarea sa în cultură pură, în cazuri de salpingite acute, din produse recoltate prin laparoscopie.

Examenul microscopic al frotiului din produse patologice nu are nici o valoare din cauza pleomorfismului deosebit de accentuat al acestor microorganisme; formele cocoide au dimensiuni sub puterea de rezoluție a microscopului optic.

Cultura se obține numai pe medii speciale (pe bază de infuzie de inimă de bou) îmbogățite cu 20% ser de cal și 10% extract proaspăt de drojdie; incubarea se face la 37°C timp de 10 zile, pentru M.pneumoniae putîndu-se prelungi, pentru un rezultat definitiv, 30 zile.

Pe medii semisolide aspectul coloniilor este deosebit de tipic. Examinate la microscop, cu obiectiv uscat (din cauza dimensiunilor foarte reduse a coloniilor, între 2o-5oo μ), apar emisferice cu o zonă centrală opacă, granulară, îngropată în grosimea mediului şi o zonă periferică translucidă dînd coloniei aspectul de „ou prăjit"

Identificarea speciilor de micoplasme se poate face pe baza caracterelor metabolice. Deosebit de fidele sînt însă testele imunologice, ca testul de inhibare a cultivării prin seruri specifice, testul de imunfluorescenţă. Aceste teste, fiind mai puţin laborioase, sînt preferate celor metabolice.

./.

24 PRINCIPII DE BAZA IN RECOLTAREA SI TRANSPORTUL PROBELOR DESTINATE EXAMENULUI BACTERIOLOGIC SI SEROLOGIC

(A) Alegerea produsului patologic şi a momentului pentru recoltarea probelor

- organul sau sistemul în suferinţă,
- poarta de intrare, căile de răspîndire şi eliminare a microbului din organism,
- stadiul bolii;
- probele recoltate trebuie să reprezinte realul produs patologic.

(B) Normele de bază pentru recoltarea probelor destinate examenului bacteriologic

- recoltarea produselor se face înaintea instituirii oricărui tratament antibacterian,
- probele trebuie recoltate în cantitate suficientă pentru a permite un examen complet,
- recoltarea probelor se face aseptic,
- probele trimise pentru analize trebuie însoţite de date informative clinice suficiente.

(C) Tehnici pentru recoltarea produselor patologice.

(D) Containere. Transportul şi conservarea probelor :

- instrumentar şi containere, pregătirea şi sterilizarea lor,
- refrigerarea probelor, indicaţii şi contraindicaţii,
- mediile de transport.

Practicianul, clinician sau epidemiolog, trimite spre analiză laboratoarelor de microbiologie şi seroimunologie probe provenite de la bolnavi, cadavre, convalescenţi, alimente ş.a.

Prin examen microscopic şi cultivare, microbiologul atestă dacă un organism sau altul este prezent în proba analizată; dacă anticorpii evidenţiaţi corespund sau nu microbului care a determinat îmbolnăvirea investigată. In funcţie de aceste rezultate un diagnostic etiologic este confirmat sau infirmat.

Nereuşita evidenţierii microorganismului infectant sau amprentei sale imunologice în probele analizate poate fi urmarea unor tehnici de laborator neadecvate, dar frecvent ea are drept cauză erori în tehnica de recoltare şi transport a probelor.

Recoltarea şi expedierea probelor către laboratoarele de microbiologie şi seroimunologie trebuie făcută de către personal special instruit.

Sarcina acestei instruiri revine microbiologului care are şi îndatorirea de a semnala deficienţele atunci cînd apar.

(A) Alegerea produselor patologice şi a momentului pentru recoltarea probelor

Numim produse patologice umori, secreţii, excreţii sau ţesuturi modificate din punct de vedere biochimic, citologic şi microbiologic ca urmare a stării de boală.

Probele destinate examenului microbiologic pentru diagnosticul etiologic al unei infecţii se recoltează din locul şi în momentul în care este cel mai verosimil a fi găsit microbul infectant.

Produsele patologice şi momentul pentru recoltarea probelor sînt stabilite în funcţie de datele clinice şi ţinînd cont de caracteristicile biologice ale microbului şi patogenia infecţiei suspectate (căi de pătrundere, răspîndire şi eliminare din organism a microbului infectant, dinamica anticorpilor ş.a.).

Probele destinate examenului microbiologic se recoltează uzual de la nivelul organului afectat: într-un abces se recoltează puroiul, într-o infecţie a căilor aeriene superioare - exsudatul faringian, într-una a căilor respiratorii inferioare - sputa, într-o meningită - lichidul cefalo-rahidian (lcr), iar într-o enterită - materiile fecale etc. etc.

In alegerea produsului patologic trebuie să

se ţină seama şi de poarta de intrare a infecţiei, căile de răspîndire şi eliminare a microbului din organism: într-o meningită virală se examinează lcr, sîngele (calea de răspîndire a virusului în organism), materiile fecale (intestinul este poarta de intrare şi calea de eliminare din organism a enterovirusurilor, agenţi etiologici frecvenţi ai meningitelor virale); într-o febră enterică se examinează materiile fecale, sîngele, măduva osoasă, urina, bila.

Stadiul bolii influenţează în mod hotărîtor posibilitatea izolării microbului infectant dintr-un produs sau altul: Salmonella typhi se izolează mai uşor şi mai frecvent din sînge în primele zile de boală, bacilul dizenteric se izolează mai uşor în stadiul acut, diareic al bolii ş.a.

Probele recoltate din diferite produse trebuie să reprezinte realul produs patologic. Sîngele, lcr, urina ş.a. nu ridică probleme din acest punct de vedere: microbul infectant este uniform dispersat în masa produsului.

O atenţie deosebită trebuie acordată însă probelor de spută, materii fecale, exsudat faringian. Dacă în loc de spută se trimite laboratorului salivă, dacă din materii fecale se recoltează fragmente la întîmplare, materii fecale de stagnare hipercontaminate, dacă în loc de exsudat faringian se trimite un tampon îmbibat cu salivă, un răspuns util din partea laboratorului este imposibil

Din acest punct de vedere instruirea personalului nu este suficientă. Trebuie instruiţi foarte bine şi bolnavii pentru a se asigura cooperarea lor în recoltarea unor produse, cum este cazul sputei (vezi capitolul 31, p. 315).

Probele destinate examenului serologic trebuie să aducă dovada apariţiei anticorpilor sau creşterii titrului lor în cursul bolii. Se recoltează 2 probe de sînge: una precoce (în momentul depistării sau internării bolnavului în spital) şi una tardivă (după 7-14 zile de la prima recoltă).

(B) Normele de bază pentru recoltarea probelor destinate examenului bacteriologic*)

(I) Recoltarea produselor se face înaintea instituirii oricărui tratament antimicrobian.

Izolarea bacteriei infectante dintr-o probă de lcr purulent devine imposibilă după 24 ore de antibioterapie. In salmoneloze coproculturile sînt negative pe parcursul administrării de antibiotice, pentru a se pozitiva frecvent după sistarea antibioticului.

In cazuri excepţionale, cînd această precauţie nu a fost respectată, se va informa laboratorul pentru a lua măsurile necesare: penicilina se

*) Date privind produsele destinate examenelor virusologice şi parazitologice se vor da la lucrările practice de virusologie şi parazitologie.

poate neutraliza prin penicilinază, sulfamidele prin acid para aminobenzoic; pentru restul antibioticelor, şi numai în cazul produselor normal sterile, se poate tenta diluarea probei într-un volum mare de bulion.

> Oricît de gravă ar fi o infecţie şi oricît de mare ar fi urgenţa terapiei antimicrobiene, întotdeauna se pot găsi cîteva minute, înaintea administrării primei doze de antibiotic, pentru recoltarea produselor patologice în vederea examenului bacteriologic corect.

(2) Probele trebuie recoltate în cantitate suficientă pentru a permite un examen complet.

(3) Recoltarea probelor se face aseptic.

Trebuie prevenite

- contaminarea probelor în cursul recoltării şi transportului;
- orice posibilitate de infectare a bolnavului în cursul recoltării probei (puncţii, cateterisme ş.a.) şi a personalului de salon (soră, infirmieră) şi de laborator în cursul transportului şi prelucrării probelor.

Probele recoltate se introduc în containere sterile care previn orice contaminare a mediului, a bolnavilor, a personalului de salon şi a celui de laborator. Foarte periculoasă din acest punct de vedere este murdărirea suprafeţei externe a containerelor cu spută şi materii fecale. Nici sîngele

şi nici celelalte umori ale organismului nu sînt inofensive, chiar atunci cînd provin de la bolnavi fără infecţii aparente sau nu sînt destinate examenului microbiologic (pericolul transmiterii virusului hepatitei).

Pentru prevenirea acestor contaminări este necesară educarea permanentă şi controlul vigilent al personalului în subordine.

(4) Probele trimise spre analiză trebuie însoţite de date informative clinice suficiente.

Aceste date sînt cuprinse în buletinul de analiză tip al unităţii medicale. Semnificaţia şi importanţa acestor date se pot grupa după cum urmează:

(i) Date necesare pentru identificarea produsului: numele şi prenumele, vîrsta bolnavului, spitalul, clinica/secţia, salonul.

(ii) Date necesare evitării unor rezultate eronate prin prelucrarea unor probe necorespunzător recoltate sau degradate în timpul transportului-conservării: data şi ora efectuării recoltei, expedierii şi primirii în laborator, condiţiile de transport şi conservare, persoana care a făcut recolta, care a asigurat transportul şi a recepţionat produsul la laborator.

(iii) Date necesare pentru alegerea tehnicilor cele mai adecvate de prelucrare a probei: diagnosticul prezumptiv, natura probei, examenul solicitat (în termeni cît mai precişi), precizarea dacă este

vorba de bolnav (în acest caz se va preciza şi data debutului bolii), convalescent sau purtător, precizări asupra antibiterapiei eventuale.

(C) Tehnici pentru recoltarea produselor patologice

Tehnicile pentru recoltarea produselor patologice destinate examenului bacteriologic variază de la produs la produs. Vor fi expuse în detaliu la fiecare capitol destinat examenului bacteriologic al principalelor categorii de produse patologice.

Tehnica recoltării sîngelui pentru examene serologice

Se recoltează 2 prize de ser (vezi p. 99).

Material necesar:

- seringă de 1o cc cu ac pentru puncţii venoase, sterilizată prin autoclavare sau fierbere;
- eprubete sterile de 16/16o mm sterilizate la autoclav;
- ser fiziologic steril;
- garou, alcool, vată.

Recoltarea se face prin puncţionarea unei vene uşor abordabile (de obicei venele de la plica cotului, iar la sugari jugulara).

Se clăteşte cu ser fiziologic steril sticlăria utilizată pentru recoltare (seringă, eprubetă).

Se aplică garoul, se antiseptizează plica cotului, se puncţionează vena şi se extrage o cantitate

de 5-1o ml sînge. Se dă drumul la garou şi se retrage acul; se fricţionează locul puncţiei cu tamponul îmbibat cu alcool.

Recoltele se fac cu ac şi cu seringă separată pentru fiecare bolnav în parte. Este interzisă utilizarea aceleeaşi seringi la mai mulţi pacienţi, chiar dacă se schimbă acul.

Se introduce sîngele în eprubetă.

Pentru separarea serului sîngele este lăsat să coaguleze la temperatura camerei în eprubeta dispusă pe un plan înclinat. După coagularea sîngelui, eprubetele sînt menţinute 1-2 ore la $37^{o}C$, pentru a grăbi retractarea cheagului. După aceasta, se desprinde cheagul de pe pereţii eprubetei cu ajutorul unei pipete Pasteur închisă la vîrf, iar eprubetele se introduc la frigider la $4^{o}C$ unde se menţin pînă a doua zi cînd serul este decantat steril

Pînă la efectuarea reacţiilor, serul se păstrează la $4^{o}C$ iar dacă durata de conservare depăşeşte cîteva zile va fi menţinut congelat la $-25^{o}C$ (în vederea congelării: dacă după decantarea de pe cheag au rămas hematii în suspensie, serul se va redecanta).

Serul destinat examenelor serologice trebuie să fie steril şi nehemolizat.
Serurile infectate şi hemolizate dau reacţii fals pozitive.

(D) Containere. Transportul şi conservarea probelor

> După eliminarea din organism şansele de supravieţuire şi multiplicare a microorganismelor patogene cresc cu atît mai mult cu cît sînt însămînţate mai repede pe medii de cultură adecvate.

Moartea microorganismelor infectante din probele destinate examenului microbiologic poate fi cauzată de:

- agenţi inhibitări de pe instrumentarul şi containerele utilizate,
- razele solare directe,
- deshidratare,
- modificări de pH,
- oxidare,
- autoliză,
- multiplicarea contaminanţilor normali ai unor produse,
- oxigenul atmosferic în cazul anaerobilor stricţi.

In principal, din acest punct de vedere, al conservării viabilităţii bacteriilor infectante, vom privi problema instrumentarului, containerelor şi a transportului probelor.

Pentru recoltarea probelor se pot folosi cutii Petri, eprubete, flacoane de sticlă, cu gura largă, de diferite capacităţi, borcane de sticlă cu capac. In vederea utilizării, toate aceste recipiente trebuie să fie foarte bine spălate.

Atît instrumentarul cît şi containerele destinate recoltării probelor pentru examene microbiologice se sterilizează exclusiv prin agenţi fizici (căldură uscată, vapori sub presiune). Este formal contraindicată utilizarea agenţilor chimici: urme din aceste substanţe sînt nocive pentru microorganisme.

Un instrument foarte des utilizat pentru recoltarea şi transportul probelor este tamponul de vată (recoltarea exsudatelor faringiene, bucale, nazale, nazofaringiene, conjunctivale, otice, genitale, puroi din supuraţii ş.a.)

Tamponul se compune din aplicator şi tamponul propriuzis (fig. 52). Ambele componente trebuie să



Fig.52 Tamponul pentru recoltarea unor probe destinate examenului microbiologic

fie lipsite de inhibitori bacterieni. Aceştia pot fi ionii metalici şi acizii graşi din vată. De aceea la confecţionarea tampoanelor

- se preferă aplicatorul de lemn celui de aluminiu sau nichel-crom,

- se tratează vata pentru îndepărtarea inhibitorilor sau pur şi simplu se înlocuieşte cu alginat de calciu sau cu fibră poliesterică.

Pentru îndepărtarea inhibitorilor din tampoanele de vată•) acestea, după confecţionare, sînt imersate în soluţie tampon Sörensen pH 7,2 la fierbere, uscate la 37°C, introduse în tuburi de sticlă prevăzute cu dop de vată (fig.52) şi sterilizate la autoclav. Dopul trebuie să fie dens, să astupe bine, pentru a evita uscarea rapidă a produsului.

Probele destinate izolării anaerobilor stricţi sînt introduse în flacoane ermetic închise sub atmosferă de azot.

Odată recoltate, probele trebuie transportate la laborator în cel mai scurt timp posibil. Sansele de izolare a bacilului dizenteric din materii fecale scad proporţional cu intervalul de menţinere a probelor pe masă (în salon, în laborator). Această bacterie relativ fragilă este distrusă în condiţiile antagonismului exercitat de flora de contaminare normală a probei, care continuă a se multiplica la temperatura camerei. Se pot da nenumărate exemple în acest sens.

•) Tampoanele utilizate curent în serviciile noastre sînt tampoane de vată.
Modul de confecţionare a tampoanelor destinate recoltării diferitelor produse (dimensiune, formă ş.a.) va fi tratat la capitolele respective.

Refrigerarea probelor este utilă atunci cînd intervalul recoltare-testare se prelungeşte. Majoritatea bacteriilor patogene supravieţuiesc foarte bine la temperatura de 4°C iar multiplicarea contaminanţilor normali este oprită sau mult încetinită.

Bacteriile care nu rezistă la refrigerare sînt puţine: meningococul, gonococul, Haemophilus influenzae. Deoarece meningococul şi gonococul mor repede chiar la temperatura camerei, însămînţarea produselor din care se aşteaptă izolarea acestor bacterii trebuie făcută direct la patul bolnavului în medii preîncălzite la 37°C sau transportul acestor produse trebuie făcut foarte repede la 37°C. Sînt situaţii care necesită o înţelegere prealabilă între clinician şi laborator.

Mediile de transport asigură o bună supravieţuire a bacteriilor patogene prin menţinerea unui pH favorabil, prevenirea deshidratării, oxidării şi autolizei enzimatice. Adăugarea la aceste medii a unor substanţe antimicrobiene cu acţiune strict specifică le poate face foarte utile pentru transportul probelor cu floră de contaminare normală (materii fecale ş.a.) Recomandăm ca mediu de transport mediul Stuart (pentru gonococ, patogenii din exsudatul faringian şi microbii sensibili la oxigen. şi mediul Cary-Blair sau soluţia glicerinată, salină, tamponată a lui Sachs (pentru materii fecale).

Pentru a asigura standardizarea condiţiilor de recoltare şi un schimb util de informaţii între laborator şi clinică, laboratorul este cel care distribuie materialul gata pregătit pentru recoltare (containere, tampoane, medii de transport, medii pentru hemoculturi etc.).

./.

MODEL DE BULETIN DE ANALIZA BACTERIOLOGICA SAU SEROLOGICA

SPITALUL..................
Clinica/Secţia............
Salonul...................

Numele................. Prenumele........Vîrsta.....
Diagnosticul prezumtiv...................................
Data îmbolnăvirii.........
Proba de cercetat.......................................
Vaccinări în antecedente.................................
Antibioterapie înaintea recoltării probei: drogul administrat (doza şi ora ultimei administrări, calea de administrare)...............................
Examenul solicitat (termeni precişi)...............
....

Data recoltării........ora....de către.............
Expediat în ziua de....ora....prin..................
Conservat: la......de la ora......la ora...........
Primit în laborator în ziua de....ora...............
de către.........................
Condiţiile în care a ajuns la laborator:
Starea recipientului....................

Rezultatul analizei...................................
....
....
Antibiograma..
....
....

Semnătura.................

PRODUSELE NECORESPUNZATOR RECOLTATE SI EXPEDIATE SINT REFUZATE DE LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE SI SEROLOGIE !

25 EXAMENELE BACTERIOLOGIC SI SEROIMUNOLOGIC IN BOLILE INFECTIOASE

Examenele de laborator furnizează clinicii
- diagnosticul etiologic al infecţiei şi
- indicaţii privind antibioticele eventual active asupra microbului infectant.

Pentru stabilirea diagnosticului etiologic al unei boli infecţioase laboratorul recurge la 2 categorii de examene:

(A) - evidenţierea şi identificarea microbului infectant: diagnostic microbiologic sau direct şi

(B) - evidenţierea anticorpilor (umorali sau celulari) apăruţi în cursul bolii: diagnostic seroimunologic sau indirect.

Metodele de laborator furnizează tot o dată epidemiologului diagnosticul etiologic al epidemiei, deci datele pentru instituirea măsurilor raţionale de profilaxie şi combatere a ei.

Diagnosticul bacteriologic, comparativ cu cel imunologic, prezintă două mari avantaje

- stabileşte precoce microbul infectant (nu este legat de intervalul necesar apariţiei anticorpilor) permiţînd instituirea în timp util a tratamentului etiologic;

- permite efectuarea antibiogramei atît de importantă pentru terapia raţională în infecţii bacte-

riene.

Diagnosticul etiologic al bolilor infecţioase

(A) Diagnosticul bacteriologic (direct)
   (1) Examenul direct macroscopic
   (2) Examenul direct microscopic
   (3) Izolarea
   (4) Identificarea
       Criterii de implicare etiologică a bacteriilor izolate
       Antibiograma

(B) Diagnosticul seroimunologic (indirect)
   (1) Teste *in vitro*
   (2) Teste *in vivo* - intradermoreacţii

(A) Examenul bacteriologic (direct)

Probele sînt prelucrate în etape succesive care conduc la izolarea şi identificarea bacteriei infectante.

(1) Examenul direct macroscopic al probei permite să se aleagă, din unele produse patologice, pentru examinarea ulterioară, fragmente caracteristice în care există şanse crescute de a evidenţia microbul infectant. Etapa este importantă în special pentru spută (din care se aleg fragmentele muco-purulente), materii fecale (din care se aleg fragmentele muco-sangvinolente, muco-purulente, granulaţii riziforme) ş.a.

(2) Examenul direct microscopic

Examenul frotiului colorat. Obişnuit, din probă se efectuează un frotiu colorat Gram și unul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa. Suspiciunea de infecţie tuberculoasă impune efectuarea şi a unui frotiu colorat Ziehl-Neelsen.

In puţine împrejurări examenul preparatului umed furnizează date utile.

Pe frotiul colorat Gram se urmăresc prezenţa, numărul, morfologia şi afinitatea tinctorială a bacteriilor.

Pe frotiul colorat cu albastru de metilen (sau Giemsa) se urmăresc prezenţa şi tipul reacţiei celulare, prezenţa, numărul şi morfologia bacteriilor.

Se examinează între lamă şi lamelă la microscopul cu fond negru: plasma pentru a evidenţia Borrelia recurentis la suspecţii de febră recurentă şi exsudatul din şancrul tare pentru a evidenţia Treponema pallidum.

Evidenţierea pe frotiu a unor bacterii cu morfologie şi afinitate tinctorială caracteristice, în produse în care în mod normal nu se evidenţiază asemenea bacterii poate preciza diagnosticul infecţiei încă din etapa examenului direct microscopic. De exemplu, diagnosticul febrei recurente, a sifilisului primar, a unei meningite pneumococice, a uretritei gonococice acute ş.a. Pentru bacteriile

fără rezistență dobîndită la antibiotice, diagnosticul astfel stabilit este suficient.

Pe frotiu nu se poate examina decît o fracțiune infimă din probă. De aceea, lipsa unui microb la examenul direct microscopic nu semnifică în mod necesar și lipsa acestuia din proba examinată.

Dacă examenul direct microscopic permite numai în puține cazuri stabilirea unui diagnostic definitiv, el furnizează în cel mai scurt timp (minute) date orientative utile

- clinicianului pentru stabilirea antibioterapiei de urgență (de exemplu într-o meningită) (a se revedea clasificarea antibioticelor după spectrul de acțiune; de făcut corelația între morfologia, afinitatea tinctorială a bacteriilor și sensibilitatea lor naturală la antibiotice; de corelat frecvența rezistenței dobîndite la un antibiotic cu frecvența utilizării acestuia într-o regiune dată; antibiotice de rezervă);
- microbiologului pentru alegerea metodei de izolare.

(3) Izolarea

Izolarea are de scop obținerea în cultură pură a bacteriei infectante. Obișnuit, se realizează *in vitro* pe medii de cultură. Mai rar, izolarea se face *in vivo* prin inoculare la ani-

male sensibile selectiv pentru o anumită bacterie.

(a) Izolarea pe medii de cultură

Alegerea mediului de cultură şi a condiţiilor de incubare sînt dictate de tipul de produs patologic, de datele clinice şi de datele examenului direct.

Din punct de vedere bacteriologic, produsele patologice se împart în 3 mari categorii:

(i) Produse normal necontaminate (conţin exclusiv microbul infectant): sînge, exsudate din cavităţile seroaselor, lcr, puroi din colecţii închise, biopsii.

Recoltarea probei şi însămînţarea acestui tip de produse în condiţii corecte de asepsie permite obţinerea p e r p r i m a m a culturii pure prin utilizarea, după caz, a mediilor lichide sau a mediilor solide.

Medii solide. Pentru izolare, datorită spectrului larg de posibilităţi pe care le oferă, se foloseşte de obicei geloza-sînge, dacă nu există indicaţii speciale pentru folosirea unui alt mediu îmbogăţit.

Medii lichide. Dacă numărul microbilor viabili din probă este foarte redus - cazul sîngelui întotdeauna, chiar în septicemii grave - izolarea pe medii solide este imposibilă. In asemenea cazuri se recurge la izolarea lor pe medii lichide în care se poate însămînţa un volum mai mare de produs.

Cel mai utilizat este bulionul glucozat. De la caz la caz, se poate recurge şi la alte medii speciale.

Insămînţarea pe medii lichide impune cele mai riguroase condiţii de asepsie la recoltarea şi însămînţarea probelor deoarece contaminarea, chiar minimă, cu un saprofit de pe tegumente sau din aer, denaturează rezultatele examenului.

(ii) Produse normal necontaminate, care se contaminează în timpul eliminării din organism: urina (contaminată cu flora uretrei distale), sputa (contaminată cu flora buco-faringiană).

(iii) Produse din zone normal contaminate: exsudat faringian, vaginal, materii fecale ş.a.

Izolarea bacteriilor din aceste 2 categorii de produse contaminate se face exclusiv pe medii solide. Prealabil însămînţării se procedează la metode de reducere a microbilor de contaminare.

Exemple:

Metode de îndepărtare a florei de contaminare

- în cazul recoltării urinii: toaletă cu apă şi săpun a mucoasei şi tegumentelor periuretrale şi recoltarea probei din jetul mijlociu;
- spălarea fragmentelor muco-purulente din spută în 3-4 băi succesive de ser fiziologic steril prealabil însămînţării;

Metode de inhibare a dezvoltării bacteriilor de contaminare

Pentru izolarea bacteriilor patogene din aceste produse se recurge la medii selective.

In eventualitatea unui număr redus de bacterii patogene se recurge la însămînţarea şi incubarea prealabilă a probei într-un mediu de îmbogăţire (cu această ocazie se schimbă raportul numeric al bacteriilor din probă în favoarea celor patogene). Mediile de îmbogăţire sînt medii lichide; incubarea probei în aceste medii constituie numai o etapă premergătoare izolării.

Metode de distrugere a bacteriilor de contaminare

De exemplu, distrugerea bacteriilor neacido-rezistente în scopul izolării bacilului tuberculozei.

(b) Izolarea i n v i v o prin inoculare la animale de laborator specific sensibile.

Inocularea animalelor se face intra-peritoneal cu produsele normal necontaminate şi subcutan cu produsele normal contaminate.

De la animalul astfel infectat experimental, bacteria va fi izolată prin hemocultură şi poate fi evidenţiată microscopic în sînge sau organe (splină, ficat, rinichi ş.a.)

Această metodă de izolare, deosebit de sensibilă, se utilizează pentru izolarea pneumococului şi a bacilului Friedländer din spută, a bacilului tuberculozei din produse paucibacilare, a leptospirelor, a cocobacilului tularemiei.

Izolarea prin inoculare la animal constituie

adesea şi metodă de identificare.

(4) Identificarea bacteriilor izolate (vezi capitolele lo-23)

Criterii de implicare etiologică a bacteriei sau bacteriilor izolate

Implicarea etiologică a unei bacterii se apreciază în funcţie de produsul din care este izolată şi de caracterele sale de patogenitate (patogenă, potenţial patogenă etc.)

(i) Cazul produselor normal necontaminate

Insăşi izolarea în cultură pură, pe medii solide sau lichide, a unei bacterii patogene este criteriul de implicare etiologică (de exemplu, izolarea din sînge a bacilului tific).

Pentru bacteriile condiţionat patogene, mai ales cele ubicuitare la nivelul tegumentelor (Staphylococcus epidermidis ş.a.) trebuie aduse dovezi suplimentare pentru a elimina posibilitatea contaminării probei în cursul recoltării:

- izolarea repetată, în condiţiile respectării unei asepsii stricte, a aceleeagi bacterii (serotip, biotip ş.a.),
- evidenţierea unei bacterii cu aceleaşi caractere morfo-tinctoriale la examenul direct,
- contextul clinic.

De exemplu: izolarea repetată în 2-3 hemocul-

turi a S. epidermidis la un bolnav cu endocardită subacută atestă implicarea etiologică a acestei bacterii.

(ii) Cazul produselor contaminate cu flora traiectelor de eliminare.

Pentru bacteriile patogene, absente normal în flora de contaminare a acestor produse, însăşi izolarea - indiferent de cantitatea în care se află prezente - este criteriul de implicare etiologică. De exemplu, izolarea bacilului tuberculozei din spută sau urină semnifică existenţa unei tuberculoze pulmonare, respectiv renale.

Incriminarea etiologică a bacteriilor condiţionat patogene, care contaminează normal aceste produse, se face pe baza criteriului cantitativ: bacteria infectantă multiplicată la nivelul leziunii (mucoasa urinară şi urină, mucoasa şi secreţiile bronşice) este prezentă în produs în cantitate mai mare decît bacteriile de contaminare normală. Criteriul cantitativ este operant dacă s-au luat precauţii speciale de reducere a contaminanţilor în timpul recoltării produsului (recoltarea urinii din jet mijlociu după toaleta organelor genitale ş.a.) sau a prelucrării lui (spălarea în băi succesive cu ser fiziologic steril a filamentelor mucopurulente din spută) şi s-a prevenit multiplicarea lor în intervalul recoltare-examinare.

(iii) Cazul produselor din zone normal contaminate. Identificarea florei bacteriene integrale a a-

cestor produse este inutilă. Se recurge la cercetarea principalelor bacterii patogene în funcţie de sindromul clinic.

Absenţa din probă a unei bacterii patogene care să explice simptomatologia clinică obligă la investigarea rolului etiologic al unora dintre bacteriile condiţionat patogene izolate sau al unor virusuri, micete ş.a. Implicarea etiologică a bacteriilor condiţionat patogene izolate în asemenea situaţii se poate face pe baza

- criteriului cantitativ: bacteria condiţionat patogenă infectantă ajunge predominantă sau practic exclusivă în produs. De exemplu, stafilococul auriu coagulazopozitiv în probele de materii fecale de la bolnavi cu enterocolită stafilococică consecutivă tratamentului cu antibiotice cu spectru larg.

- Testele de patogenitate, i n v i t r o sau i n v i v o, sînt de multe ori utile. De exemplu, evidenţierea unei tulpini enteropatogene de Escherichia coli în fecalele unui sugar cu diaree sau cercetarea şi evidenţierea i n v i v o a producerii de enterotoxină de către o tulpină de Esch.coli izolată de la un bolnav diareic la care nu a putut fi incriminat etiologic altul din izolaţi.

- Autoserodiagnosticul poate tranşa cazurile în care interpretarea pe baza celorlalte criterii este dificilă. Se cercetează apariţia sau creşterea

titrului anticorpilor în cursul infecţiei faţă de tulpina suspicionată ca infectantă.

Testarea sensibilităţii la antibiotice

In infecţiile cu bacterii al căror spectru natural de sensibilitate a rămas constant pentru unele antibiotice (de exemplu, sensibilitatea streptococului β hemolitic grup A, treponemei sifilisului ş.a. pentru penicilină) stabilirea diagnosticului etiologic permite implicit şi stabilirea antibioterapiei.

Cu totul alta este situaţia în infecţiile determinate de bacterii care prezintă frecvent tulpini cu rezistenţă dobîndită la antibiotice (stafilococul, bacilul piocianic, Enterobacteriaceae ş.a.) In aceste cazuri antibiograma oferă singura posibilitate de insituire a antibioterapiei raţionale.

> Pentru clinician este mai utilă antibiograma primită a doua zi decît o identificare completă a bacteriei infectante obţinută după zile sau săptămîni.

Bineînţeles, antibiograma se va efectua numai pentru bacteria infectantă, apreciată ca atare conform criteriilor toomai enumerate.

> Este ilogic şi periculos pentru bolnav de a efectua antibiograma pe orice bacterie izolată dintr-un produs patologic (mai ales din cele cu floră de contaminare normală) înainte de a aduce dovada că este bacteria infectantă.

Antibiogramă pe cultură primară (ACP) şi antibiogramă pe cultură secundară (ACS)

Laboratorul îşi îndeplineşte rolul în măsura în care furnizează clinicianului în cel mai scurt timp informaţii privind comportamentul actual*) şi virtual*) al populaţiei bacteriene infectante faţă de o sumă de antibiotice judicios alese.

ACP evidenţiază, atunci cînd este posibil de efectuat (vezi capitolul 8, p. 123), comportamentul faţă de antibiotice a unui eşantion de zeci şi sute de mii de bacterii din populaţia infectantă detectînd proporţia reală a variantelor rezistente selecţionabile pe parcursul antibioterapiei. In plus, evită apariţia falselor sensibilităţi prin eventuala pierdere a fR în subculturi.

Aceste performanţe nu pot fi realizate de ACS, în ciuda posibilităţilor de standardizare mai riguroasă a metodei, pentru simplul motiv că în ACS testarea se face pentru descendenţii numai a cîtorva bacterii (maximum 10 dacă bacteriologul este foarte conştiincios !!) din populaţia infectantă. Oricum, atunci cînd sîntem obligaţi să recurgem la ACS, aceasta trebuie făcută realmente pe cultură secundară

---

*) Prin comportament actual faţă de antibiotice al populaţiei bacteriene infectante înţelegem sensibilitatea sau rezistenţa ansamblului populaţiei bacteriene infectante în momentul izolării.

Prin comportament virtual înţelegem comportamentul faţă de antibiotice a populaţiei bacteriene infectante pe parcursul antibioterapiei, comportament condiţionat de existenţa şi proporţia variantelor antibiorezistente selecţionabile.

şi nu pe culturi terţiare ş.a. pentru că odată cu creşterea numărului de pasaje creşte şi riscul segregării factorului R.

In fine, al doilea motiv pentru care ACP trebuie să fie practicată, atunci cînd este posibil, rezidă în rapiditatea cu care pune la dispoziţie rezultatele: 18-24 ore de la începutul examinării produsului patologic.

(B) Diagnosticul seroimunologic (indirect)

Diagnosticul indirect se practică

(i) în infecţii în care agentul etiologic nu poate fi izolat, fie din cauză că se află cantonat în focare inabordabile pentru prelevarea produsului (sifilis latent, bruceloză), fie pentru că nu poate fi cultivat (infecţia sifilitică);

(ii) în toate cazurile în care nu a fost posibilă izolarea agentului etiologic (ivestigarea bolnavului după dispariţia bacteriei infectante din produse patologice abordabile etc.);

(iii) pentru precizarea diagnosticului în unele infecţii cu bacterii condiţionat patogene (autoserodiagnostic).

Pentru evidenţierea anticorpilor la bolnav (vezi capitolul 7) se recurge la

- teste i n v i t r o : diagnosticul serologic şi la

- teste i n v i v o: teste intradermice pentru evidenţierea sensibilizărilor de tip întîrziat sau teste intradermice de neutralizare.

Bacteriemia şi septicemia
Bacterii care se izolează în hemocultur
Cînd este indicată hemocultura?
Momentul şi numărul recoltelor
Recoltarea
Insămînţarea
Urmărirea şi
Interpretarea hemoculturii

Sîngele normal este steril.

In unele infecţii în curentul sangvin pătrun bacterii realizînd o bacteriemie sau o septicemie

Bacteriemia se caracterizează prin prezenţa tranzitorie a unei bacterii în sînge ca urmare a cărcării bacteriene, limitată în timp, de la nivel unui focar infecţios sau a unei mucoase lezate. St rea bacteriemică poate fi lipsită de expresie cli că sau cel mult se însoţeşte de frison şi febră.

Septicemia este o infecţie generală determin de descărcări masive, continui sau recurente, în ge a bacteriilor dintr-un focar infecţios iniţial.

Prezenţa în curentul circulator a bacteriilor care se multiplică activ, a toxinelor lor şi a pro selor de dezintegrare celulară se traduce clinic p sindromul septicemic - frisoane, febră, prostraţie, erupţii cutanate - care lasă pe al doilea plan simptomatologia focarului infecţios iniţial. In septic

mia netratată mortalitatea este foarte mare, tendința la vindecare spontană este o excepție.

Diagnosticul septicemiei și bacteriemiei se stabilește prin hemocultură.

Bacteriile care se izolează în hemoculturi, în ordinea frecvenței actuale, sînt:

Stafilococi coagulazo-pozitivi,
Bacili gram-negativi intestinali,
(Escherichia, Klebsiella,
Serratia, Proteus),
Streptococi α și β-hemolitici,
Pneumococi,
Enterococi,
Haemophilus influenzae,
Clostridium perfringens,
Pseudomonas aeruginosa,
Anaerobi nesporulați,
Neisseria meningitidis,
Specii de Salmonella,
Stafilococi coagulazo-negativi,
Listeria monocytogenes,
Specii de Brucella,
Leptospira

Cînd este indicată hemocultura ?

1. La pacienții cu sindrom septicemic.

2. La pacienții suspecți de infecții bacteriene sistemice specifice (febră tifoidă, bruceloză, pestă, tularemie, morvă).

3. La pacienții cu endocardite bacteriene subacute.

4. In evoluția unor infecții bacteriemice deter-

minate de bacterii condiţionat patogene: pneumonii, meningite, peritonite, infecţii puerperale, infecţii ale plăgilor şi arsurilor, osteomielite, infecţii ale căilor urinare, infecţii ale căilor biliare ş.a.

5. La pacienţii cu sindroame febrile fără cauză precizată.

6. Hemocultura se mai poate impune în condiţii bacteriemice cum sînt: intervenţiile operatorii în focare infecţioase cronice (instrumentaţia căilor urinare ş.a.), la pacienţi cu cateterism venos prelungit, la pacienţi debilitaţi trataţi cu imunosupresive sau/şi prelungit cu antibiotice.

Momentul şi numărul recoltelor

O singură hemocultură, chiar de la un bolnav cu septicemie, poate să rămînă negativă. De aceea, la fiecare pacient cu indicaţie pentru hemocultură trebuie efectuate cel puţin 3-4 hemoculturi.

Hemoculturile trebuie efectuate înaintea administrării oricărei terapii antimicrobiene.

Concentraţii sanguine de antibiotic insuficiente pentru a asigura distrugerea bacteriei *in vivo* pot împiedica izolarea ei în hemocultură.

Cînd terapia antimicrobiană este o urgenţă

sindrom septicemic, şoc postoperator fără cauză evidentă după intervenţii pe căile genito-urinare

ş.a., meningite bacteriene, infecţii puerperale şi alte infecţii tisulare rapid extensive - se efectuează, înainte de administrarea primei doze de antibiotic, minimum 3 hemoculturi la intervale de 1/2 oră.

La pacienţii cu endocardită subacută cele 3-4 hemoculturi necesare se pot efectua în intervalul de 24-48 ore cît se poate temporiza terapia antimicrobiană.

> Frisonul şi febra apar după cca 1-2 ore de la pătrunderea bacteriilor în sînge.

De aceea, ori de cîte ori este posibilă temporizarea antibioterapiei (endocardite bacteriene subacute etc.) hemoculturile se vor efectua înaintea apariţiei unui croşet febril previzibil.

Este de dorit ca hemoculturile să se practice imediat ce frisonul şi febra şi-au făcut apariţia la pacienţi cu infecţii ale căilor urinare sau biliare, cu plăgi sau arsuri infectate, cu cateterizare venoasă prelungită, instrumentaţii ale căilor urinare ş.a.

Intr-o serie de infecţii bacteriemice cum sînt pneumonia pneumococică, febra tifoidă, tularemia ş.a. procentul hemoculturilor pozitive este mai mare în primele zile de boală şi scade progresiv pînă la anulare în următoarele zile.

In infecţii cronice, cum este bruceloza, şansa

unei hemoculturi pozitive creşte în cursul perioadelor febrile şi de exacerbare a simptomatologiei.

Recoltarea probelor de sînge pentru hemocultură se face în condiţii de riguroasă asepsie.

Material necesar

- seringă sterilă de 2o ml, de preferat tip Luer pentru a fi sterilizată gata montată,
- materiale pentru decontaminarea tegumentului: săpun lichid, alcool iodat 2% sau spirt medicinal, eter, tampoane de vată, pensă,
- garou,
- flacără,
- medii de cultură.

Persoana care efectuează hemocultura trebuie să fie conştientă de precauţiile pe care trebuie să le ia pentru a evita orice posibilitate de contaminare în timpul recoltării sau a însămînţării sîngelui.
Pătrunderea unei singure bacterii saprofite într-o plagă operatorie poate să nu aibă nici o urmare; ţesuturile se apără singure. Contaminarea hemoculturii cu o singură bacterie o compromite cu siguranţă.

Cel care efectuează hemocultura nu trebuie să poarte obligator mască dar trebuie să lucreze cu mîinile bine spălate şi uscate.

Se inspectează plica cotului şi se aşează pacientul cu braţul confortabil pentru a evidenţia cît mai bine vena aleasă pentru puncţie.

Se decontaminează plica cotului, pe o suprafață cît mai largă, cu săpun lichid apoi cu alcool iodat (sau spirt medicinal) și eter. Pentru fiecare soluție se folosesc tampoane noi de vată. In final, tegumentul decontaminat trebuie să rămînă perfect uscat.

Se aplică, proximal față de regiunea astfel pregătită, un garou care să permită evidențierea venelor. Se puncționează, fără palpare prealabilă, vena cea mai accesibilă și se extrag aproximativ 1o-12 ml sînge.

Sîngele extras este imediat însămînțat în mediu de cultură. Pentru aceasta, acul seringii va fi îndepărtat fără a atinge amboul.

In timpul recoltării și însămînțării sîngelui ușile și ferestrele trebuie închise pentru a se evita formarea curenților de aer.

Insămînțarea

Cu excepția infecțiilor bacteriene sistemice specifice, simptomatologia clinică nu sugerează prezența în sînge a unei anumite bacterii, iar densitatea bacteriilor în probă este mică, motiv pentru care examenul microscopic nici nu se practică.

De aceea, însămînțarea se va face pe medii care să permită multiplicarea unui număr cît mai mare de specii microbiene aerobe și anaerobe cu exigențe nutritive diferite. Se vor folosi:

- un balon cu 1oo ml bulion infuzie creier-ini-

mă şi

- un tub de 25ox25 mm cu 5o ml bulion VF în prealabil regenerat. Ambele conţin citrat de sodiu în concentraţie de o,5%

In fiecare din aceste medii sînt însămînţaţi cîte 5 ml sînge. Proporţia minimă de 1:1o între sînge şi mediu trebuie respectată pentru a anula astfel efectul antibacterian al sîngelui. Utilizarea unui anticoagulant previne înglobarea unor bacterii din sînge în coagul opac facilitînd vizualizarea culturii.*)

Cel mai recomandat anticoagulant pentru hemoculturi este liquoidul (sodium polyanethol sulfonat) care inhibă coagularea sîngelui, neutralizează efectul bactericid al serului, previne fagocitoza şi inactivează unele antibiotice: streptomicina, kanamicina, gentamicina şi polimixina B.

Indicatii speciale. Sînt situaţii cînd clinici-

---

*) In endocardita subacută, unde streptococul viridans intervine ca agent etiologic în procent important de cazuri, se recomandă efectuarea hemoculturilor folosind metoda cheagului de fibrină preconizată de prof.Eugenia Duca: Se folosesc tuburi cu bulion glucozat o,2% repartizat în coloană înaltă. Prealabil însămînţării, mediul este regenerat. Se însămînţează mai multe tuburi cu cîte o,5-1,5 ml sînge prin prelingere pe peretele tubului deasupra mediului; tuburile sînt lăsate în repaus 3o min. pentru ca să se formeze cheagul de fibrină ancorat de peretele tubului. Coloniile de streptococ viridans dezvoltate în porţiunea superioară, transparentă a cheagului se observă cu uşurinţă.

anul solicită hemocultura pentru o anumită bacterie. Atunci se impune folosirea unor tehnici sau medii speciale.

Pentru bacilul tific, deşi cultivă pe medii obişnuite, se indică folosirea bulionului bilă. In caz de bruceloză hemoculturile se fac de preferinţă în bulion ficat sau medii difazice; totodată se face şi inocularea sîngelui intra-peritoneal la cobai. Pentru leptospire hemocultura se face în apă tamponată îmbogăţită cu ser de iepure; de asemenea sîngele este inoculat intra-peritoneal la cobai.

Urmărirea şi interpretarea

Hemoculturile sînt incubate la 37°C şi examinate zilnic timp de o săptămînă şi apoi după încă o săptămînă, la 14 zile putîndu-se da un rezultat definitiv.*)

Pozitivarea hemoculturilor se urmăreşte:

- macroscopic: se observă apariţia coloniilor pe stratul de hematii de la fundul balonului (de exemplu, coloniile de stafilococ), turbiditatea, hemoliza, modificarea culorii mediului, apariţia bulelor de gaz pe mediile anaerobe, apariţia coloniilor pe cheagul de fibrină (dacă s-a folosit metoda cheagului de fibrină);

*) Pentru izolarea brucelelor hemocultura se urmăreşte pînă la 30 zile.

anul solicită hemocultura pentru o anumită bacterie. Atunci se impune folosirea unor tehnici sau medii speciale.

Pentru bacilul tific, deşi cultivă pe medii obişnuite, se indică folosirea bulionului bilă. In caz de bruceloză hemoculturile se fac de preferinţă în bulion ficat sau medii difazice; totodată se face şi inocularea sîngelui intra-peritoneal la cobai. Pentru leptospire hemocultura se face în apă tamponată îmbogăţită cu ser de iepure; de asemenea sîngele este inoculat intra-peritoneal la cobai.

Urmărirea si interpretarea

Hemoculturile sînt incubate la 37°C şi examinate zilnic timp de o săptămînă şi apoi după încă o săptămînă, la 14 zile putîndu-se da un rezultat definitiv•)

Pozitivarea hemoculturilor se urmăreşte:

- macroscopic: se observă apariţia coloniilor pe stratul de hematii de la fundul balonului (de exemplu, coloniile de stafilococ), turbiditatea, hemoliza, modificarea culorii mediului, apariţia bulelor de gaz pe mediile anaerobe, apariţia coloniilor pe cheagul de fibrină (dacă s-a folosit metoda cheagului de fibrină);

•) Pentru izolarea brucelelor hemocultura se urmăreşte pînă la 30 zile.

- microscopic: se fac frotiuri colorate Gram, care se examinează cu imersia şi în funcţie de rezultatul acestui examen se procedează la

- subculturi pe geloză sînge, geloză chocolat, medii diferenţiale în cazul bacililor gram-negativi, incubate aerob în atmosferă cu CO_2 sau anaerob.

Cînd examenul microscopic evidenţiază în hemocultură un microorganism cu o densitate optimă sau care poate fi ajustată optim, se efectuează antibiograma difuzimetrică folosind drept inoculum hemocultura pozitivă.

Pozitivarea hemoculturii şi rezultatul antibiogramei se impune a fi comunicate clinicianului într-un interval de timp cît mai scurt posibil. Identificarea ca specie a microorganismului izolat urmează a se efectua.

Prin antibiograma difuzimetrică se face o primă selecţie a antibioticelor active in vitro; în continuare se recomandă stabilirea CMI pentru antibioticul ales, urmată de verificarea concentraţiilor realizate în sînge de acest antibiotic (vezi capitolul 9, pp 127-131).

Mai importantă decît identificarea ca specie a microorganismului izolat este implicarea sa ca agent etiologic întrucît criteriul de patogenitate nu are valoare în acest caz.

Pentru speciile oportuniste (condiţionat sau accidental patogene) posibilitatea intervenţiei lor ca contaminanţi este eliminată prin izolarea aceluiaşi microorganism din hemoculturi repetate*)

*) Cei mai frecvenţi contaminanţi sînt *Staphylococcus epidermidis* şi bacilii difterimorfi. Bacilii difterimorfi pot fi însă confundaţi morfologic cu *Listeria monocytogenes*, specie patogenă; de aceea nu vom eticheta o hemocultură drept contaminată cu bacili difterimorfi fără practicarea testelor de diferenţiere.

27 EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL PUROIULUI

Sînt de considerat

(i) puroiul din colecţii închise,

(ii) puroiul din colecţii fistulizate şi de pe suprafeţe: cutanată (plăgi, arsuri, ulcere cutanate cronice) sau mucoase (conjunctivală, uretrală ş.a.).

Recoltarea probelor

Materiale necesare

- seringă etanşă şi ace cu calibru mare sterilizate;
- pipete Pasteur;
- tampoane pentru recoltări bacteriologice;
- materiale pentru decontaminare: apă sau ser fiziologic sterile, săpun lichid, spirt medicinal, eter, tampoane de vată, comprese, pensă;
- eprubete 16/160 mm.

Recoltarea de la nivelul colecţiilor închise (abcese, exsudate din cavităţile seroaselor ş.a.) se face prin puncţie şi aspiraţie cu seringa prevăzută cu un ac de calibru mare.

Recoltările din veziculele cutanate pot fi făcute prin puncţie şi aspiraţie cu pipeta Pasteur.

Decontaminarea tegumentului în vederea punc-

ționării unei colecții purulente se face cu aceleași precauții ca și pentru hemocultură.

Recoltarea de la nivelul fistulelor se face prin aspirație cu seringa după decontaminarea tegumentului în jurul fistulei și eliminarea primei porțiuni a puroiului.

Recoltarea de la nivelul plăgilor superficiale, arsurilor, impetigo, conjunctivei etc. se face cu tamponul.

Dacă plaga sau arsura este acoperită cu un exsudat purulent abundent se va proceda mai întîi la îndepărtarea, prin spălare cu ser fiziologic sau apă sterilă, a puroiului superficial intens contaminat. Dacă există cruste, vor fi detașate. Recolta trebuie făcută din imediata vecinătate a țesutului viu.

Recoltarea cu tamponul de la nivelul ulcerelor cutanate cronice nu dă rezultate bune din cauza masivei contaminări a exsudatului de la acest nivel. Rezultate mai bune se obțin dacă se recoltează lichidul interstițial de la periferia ulcerului. Se decontaminează tegumentul vecin marginii ulcerului cu săpun lichid, spirt medicinal și eter. Se puncționează tegumentul sănătos cu un ac hipodermic steril. Se introduce acul pînă cînd vîrful său ajunge în vecinătatea marginii ulcerului și sub su-

prafaţa acestuia. Se comprimă uşor ţesutul indurat din jurul acului. Se retrage puţin acul şi se aspiră cu o seringă sterilă etanşă. Cantitatea minimă de lichid interstiţial astfel obţinută este folosită extemporaneu pentru efectuarea a 1-2 frotiuri şi însămînţare.

Puroiul aspirat cu seringa şi introdus în eprubetă ca şi probele recoltate pe tampoane sînt imediat expediate la laborator.)

Examenul macroscopic şi microscopic al probelor de puroi permite orientarea diagnosticului şi interpretarea rezultatelor culturii.

Se notează consistenţa, culoarea, mirosul, eventual prezenţa granulelor ş.a.

Puroiul cremos, bine legat apare în infecţiile stafilococice; puroiul fluid în cele streptococice; puroiul cazeos în cele cu bacil Koch.

Puroiul fluid cu granule mici (cca 0,25 mm diametru) albe sau gălbui sugerează o supuraţie actinomicotică.

Puroiul albastru verzui poate să apară în infecţiile cu bacil piocianic; puroi verde în cele pneumococice.

.) Procentajul izolării anaerobilor oxigen-sensibili din probele de puroi creşte considerabil dacă transportul acestora se face în containere etanşe sub atmosferă de azot sau bioxid de carbon lipsită de O_2

Puroiul brun-cenuşiu murdar şi fetid sugerează o infecţie cu anaerobi.

Din probă se efectuează un frotiu colorat Gram pe care se urmăresc prezenţa, numărul şi varietatea morfo-tinctorială a bacteriilor:

- coci gram-pozitivi în grămezi sau lanţuri (probabil stafilococi sau streptococi, aerobi sau anaerobi);
- bacili gram-negativ cu capete rotunjite sau efilate (probabil Enterobacteriaceae, bacil piocianic sau anaerobi);
- bacili gram-pozitivi sporulaţi - se va nota forma şi dispoziţia sporului (posibil specii de Clostridium);
- bacili gram-pozitiv ramificaţi (probabil Actinomyces sau Corynebacterium) ş.a.

Dacă puroiul provine dintr-o leziune subacută sau cronică, frotiul Ziehl-Neelsen este obligator pentru a urmări prezenţa micobacteriilor.

Dacă în probă sînt prezente granule, un granul este zdrobit între 2 lame de microscop. După separarea lamelor, frotiurile astfel obţinute sînt fixate şi colorate: unul gram şi altul Ziehl-Neelsen. Pentru coloraţia Ziehl-Neelsen, în acest caz, decolorarea nu va depăşi 5-10 sec.

Pe frotiul colorat Gram, actinomicetul apare ca o masă încîlcită de micelii ramificate gram pozitiv cu forme măciucate Gram-negative la periferie.

Coloraţia Ziehl-Neelsen permite în aceste cazuri diferenţierea între Actinomyces şi Nocardia; nocardiile pot să apară acido-rezistente; în contrast, Actinomyces sînt totdeauna neacido-rezistente.

Rezultatele examenului direct microscopic sînt imediat comunicate clinicianului ca rezultate de etapă. Sînt utile pentru orientarea terapeutică.

Cultura

Prima zi. Proba se epuizează pe suprafaţa a 2 plăci cu geloză sînge, din care una se incubează aerob şi cealaltă anaerob.

Dacă proba provine dintr-o colecţie închisă se va însămînţa şi într-un tub cu bulion VF pentru izolarea anaerobilor. Acesta permite şi izolarea anaerobilor facultativi. Mediul lichid favorizează izolarea bacteriei infectante mai ales atunci cînd numărul indivizilor viabili din probă este mic.

Puroiul recoltat din fistule, plăgi, arsuri ş.a. nu se însămînţează în mediu lichid. Aceste infecţii sînt frecvent mixte iar probele contaminate în proporţii variate cu flora normală a regiunii în care evoluează supuraţia.

Dacă frotiul Gram a evidenţiat o densitate bacteriană suficientă, indiferent de provenienţa probei de puroi, din colecţie închisă ori din plagă sau arsură, se efectuează o antibiogramă pe cultură primară.

A doua zi. Se examinează cu atenţie plăcile cu ochiul liber şi cu lupa de mînă în lumină directă şi în lumină reflectată.

Dacă în aceste condiţii nu a apărut o cultură, plă-

cile se reincubează pentru alte 24 ore, incubarea aerobă făcîndu-se în borcan cu lumînare.

Dacă a apărut o cultură, se efectuează un frotiu Gram din fiecare tip de colonie dezvoltată. Se compară caracterele morfo-tinctoriale ale izolaţilor aerob şi anaerob cu cele ale bacteriilor de pe frotiul gram din probă.

Dacă între izolaţi şi frotiul din probă există discrepanţe (cultură săracă faţă de numărul bacteriilor observate în frotiul original, dintre izolaţi lipseşte un tip morfo-tinctorial prezent în frotiul original ş.a.) incubarea trebuie continuată pentru ambele plăci.

Dacă a apărut o cultura pură pe ambele plăci şi frotiul gram indică o identitate morfo-tinctorială, izolatul este un facultativ anaerob şi se identifică pornind de la una din culturi.

Dacă pe ambele plăci cultura este mixtă, chiar dacă frotiul evidenţiază tipuri de bacterii cu aceleaşi caractere morfo-tinctoriale, nu se poate şti în acest stadiu care sînt anaerobe şi care facultativ anaerobe. Se procedează la repicarea fiecărui tip de colonie de pe placa incubată anaerob pe o placă cu geloză sînge care se incubează aerob. Izolaţii care nu cultivă în aceste condiţii sînt anaerobi. Ei vor fi identificaţi pornind de la placa anaerobă. Restul sînt facultativ anaerobi şi vor fi identificaţi ca atare.

Izolaţii care nu se regăsesc pe placa anaerobă sînt strict aerobi.

Pentru izolaţii anaerobi nesporulaţi este suficientă încadrarea într-un grup morfo-tinctorial (coci gram-pozitiv sau gram-negativ, bacili gram-pozitivi sau gram-negativi ş.a.). Pentru clostridii este necesară identificarea. Identificarea este de asemenea necesară pentru aerobi sau anaerobii facultativi.

Dacă antibiograma pe cultură primară nu poate fi interpretată, se poate proceda la antibiograma

pe cultură secundară.

Interpretarea rezultatelor

Infecţiile plăgilor şi arsurilor sînt infecţii mixte. Bacteriile izolate variază larg în funcţie de împrejurările în care s-a produs plaga (plăgi traumatice: plăgi în viaţa civilă, plăgi de război, plăgi muşcate; plăgi chirurgicale), localizarea plăgii, vechimea ei ş.a.

Plăgile traumatice se infectează cu microbiota indigenă a pielii şi cavităţilor vecine ariei lezate precum şi cu saprofiţii din praf.

In ordinea frecvenţei se izolează:

- *Staphylococcus aureus*,
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Streptococcus pyogenes*,
- *Escherichia coli*,
- Bacili difterimorfi,
- Specii de *Bacillus*,
- *Proteus*,
- Specii de *Pseudomonas*,
- Streptococi α-hemolitici,
- Streptococi β-hemolitici (alţii decît grup A),
- Coci gram-pozitivi anaerobi,
- Bacili anaerobi nesporulaţi gram-pozitivi şi gram-negativi,
- *Clostridium perfringens*

Plăgile din regiunea coapselor, feselor şi abdomenului inferior sînt mai frecvent infectate cu bacili gram-negativi intestinali.

Plăgile de război sînt mai frecvent infectate cu anaerobi, inclusiv clostridii, din cauză că sînt

plăgi delabrante, cu mortificări de țesuturi, contaminate cu pămînt și fecale și din cauza temporizării tratamentului chirurgical.

Clinicianul trebuie avertizat asupra prezenței clostridiilor într-o plagă. El este cel care hotărăște asupra semnificației acestora: bacterii infectante sau de contaminare. Diagnosticul gangrenei gazoase și tetanosului sînt diagnostice clinice. Deci prezența clostridiilor într-o plagă nu înseamnă obligator gangrenă gazoasă sau tetanos.

Plăgile mușcate sau zgîriate de animale se pot infecta cu Pasteurella septica.

Plăgile operatorii din zone normal contaminate se infectează mai frecvent decît cele din zone normal sterile. Si aici intervin în infecție organismele din microbiota regiunii anatomice în care s-a intervenit.

Frecvent în infecțiile plăgilor operatorii intervin tulpini de spital: stafilococi coagulazo-pozitivi, bacil piocianic, Escherichia coli (tulpini hemolitice), Proteus.

Arsurile de asemenea se infectează cu microbiota pielii și saprofiți oportuniști din praf. In mediu de spital infectarea arsurilor cu tulpini de spital este de temut și greu de eradicat.

Rar, în infecțiile plăgilor și arsurilor intervin

Haemophilus   Actinomyces, Nocardia,

Pneumococul,   Bacilul difteric.

In plăgi şi arsuri este greu de stabilit ponderea fiecărui izolat, în fenomenul morbid, numai pe baza examenului bacteriologic al puroiului, mai ales atunci cînd printre izolaţi nu sînt patogeni recunoscuţi (Streptococcus pyogenes, de exemplu)

Frecvent, însă, aceste infecţii sînt bacteriemice. De aceea, nu se va pierde din vedere necesitatea efectuării de hemoculturi repetate la bolnavii cu plăgi şi arsuri infectate, mai ales dacă au frison şi febră. Bacteria izolată din hemocultură este cea cu pondere majoră în infecţie.

Antibiograma pe cultură primară pentru puroiul din aceste infecţii este importantă din 2 motive:

(i) sînt infecţii mixte în care tratamentul antimicrobian nu trebuie aplicat faţă de bacteria X sau Y ci faţă de toate bacteriile infectante în proporţiile şi în relaţiile în care se află ele în focarul infecţios.

(ii) ACP constituie în acelaşi timp o mai bună metodă de izolare a bacteriilor din asemenea probe decît simpla epuizare. Nu este o raritate cînd pe placa cu ACP se izolează mai multe tipuri de bacterii decît pe plăcile pe care s-a făcut epuizarea simplă. După cum nu este o raritate situaţia în care, curînd după administrarea unui antibiotic, din proba de puroi nou recoltată se izolează (este demascată) o altă bacterie decît cea evidenţiată iniţial.

In leziunile ulcerative ale pielii cu evoluţie cronică trebuie eliminată în primul rînd posibilitatea etiologiei sifilitice (examen serologic). Spectrul etiologic al infecţiilor acestor leziuni include:

Streptococ β-hemolitic (grup A sau alte grupe),
Streptococi anaerobi,
Stafilococ auriu,
Specii de micobacterii,
Specii de Actinomyces,
rar sînt în cauză:
Erysipelothrix,
Bacilul difteric.

Bacteriile evidenţiate în puroiul din colecţii închise sînt agenţii etiologici ai infecţiei. Contaminarea acestor probe cu saprofiţi ai pielii sau mediului este rară (de regulă urmarea unor deficienţe în tehnica de recoltare) şi redusă cantitativ.

Bacteriile izolate în aceste împrejurări sînt:

Stafilococul auriu,
Streptococcus pyogenes,
Pneumococul,
M.tuberculosis,
Specii de Salmonella,
N.gonorrhoeae,
N.meningitidis,
Specii de Brucella ş.a.

Examenul bacteriologic al exsudatului conjunctival din conjunctivite acute se conduce ca şi examenul oricărui exsudat purulent. Pentru însămînţări se preferă geloza cu sînge de iepure sau cal ori geloza chocolat sau geloza sînge cu strie de stafilococ. Moraxella lacunata se izolează mai uşor pe mediul Loeffler.

Spectrul etiologic al conjunctivitelor acute, cel mai frecvent, include:

Stafilococul auriu,
Specii de Haemophilus,
Pneumococul,
N.gonorrhoeae,
Streptococi hemolitici,
Bacili coliformi,
Pseudomonas,
Moraxella lacunata (rar),
Bacilul difteric (rar),
Virusuri ş.a.

Alte microorganisme (bacilli difterimorfi, stafilococi coagulazo-negativi ş.a.) sînt numai contaminanţi.

28 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL MENINGITELOR
EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL LICHIDULUI CEFALO-RAHIDIAN

Lichidul cefalo-rahidian normal este steril.

In cursul infecţiei meningiene se produc

- pătrunderea şi multiplicarea agentului infecţios (bacterie, virus, ciupercă ş.a.) în lichidul cefalo-rahidian;

- modificări citologice şi biochimice, unele din ele urmare a evoluţiei fenomenelor inflamatorii meningiene, altele legate de prezenţa şi multiplicarea microbului în lichidul cefalo-rahidian.

Infectarea meningelor se poate produce

a) Pe cale hematogenă în cursul unei bacteriemii. De exemplu, nazofaringită meningococică ⟶ bacteriemie ⟶ meningită meningococică.

b) Direct din nazo-faringe prin tecile limfatice olfactive (meningococul, pneumococul, Haemophilus influenzae)

c) din focare infecţioase juxtameningiene (otomastoidită, sinuzită, tromboflebita sinusului cavernos ş.a.)

d) din exterior (nasofaringe, conduct auditiv extern, tegumente ş.a.) după fracturi craniene (meningitele traumatice cu cel mai variat spectru etiologic), anomalii congenitale (menigococul, pneumococul) şi puncţii rahidiene sau intervenţii chirurgicale pe nevrax (meningitele iatrogene cu tulpini bacteriene de spital).

Apărută pe o cale sau alta, infecţia meningelor este este un focar bacteriemic.

Aşadar, cercetarea prezenţei bacteriilor în lichidul cefalo-rahidian este o etapă indispensabilă pentru diagnosticul etiologic al unei meningite. Examenele citologice şi biochimice efectuate în paralel orientează acest diagnostic.

La bolnavul cu meningită bacteriană hemocultura poate fi de asemenea de folos pentru izolarea bacteriei infectante. Examenul bacteriologic al exsudatului nazofaringian, din urechea medie ş.a. sînt examene complementare care pot stabili focarul primar al infecţiei.

Bacteriile care se izolează din lcr, în ordinea frecvenţei, sînt:

(i) la nou-născut şi sugarul pînă la 2 luni

Enterobacteriaceae
(Escherichia, Salmonella ş.a.),
Stafilococi coagulazo-pozitivi,
Pneumococi,
H.influenzae,
Bacilul piocianic,
L.monocytogenes

(ii) la copil

Neisseria meningitidis,
Pneumococi,
Haemophilus influenzae

(iii) la adult

Pneumococi,
N.meningitidis,
Stafilococi coagulazo-pozitivi,
Bacili gram-negativi,
Listeria monocytogenes.

Meningita tuberculoasă apare cu o frecvenţă variabilă şi în general mai redusă în raport cu alte etiologii (meningococică, pneumococică ş.a.)

Recoltarea şi transportul probelor de lichid cefalo-rahidian

Recoltarea se face prin puncţie, obişnuit, lombară, în condiţii riguros aseptice. Cantitatea necesară pentru examen, 5-lo ml, se recoltează în 2 tuburi de centrifugă şi se transportă fără întîrziere la laborator. Pe durata transportului şi în laborator, pe parcursul examinării, proba se menţine la 37°C.

Examenul de laborator

(1) Examenul macroscopic

Lichidul cefalo-rahidian normal este incolor şi clar. Se urmăresc: culoarea, turbiditatea, existenţa eventuală a unui depozit sau cheag.

In cursul unei meningite, în funcţie de importanţa reacţiei celulare, lichidul cefalo-rahidian poate fi clar, opalescent sau purulent.

Unul din tuburi, după prelevarea cantităţii de lichid necesară numărării elementelor celulare, este centrifugat lo min. la 3ooo rpm. După centrifugare se notează aspectul supernatantului şi al sedimentului. Supernatantul este decantat steril şi supus examenelor biochimice. Din sedimentul resuspendat într-o mică cantitate de lichid

- se fac însămînţări pentru izolare şi
- se efectuează 3 frotiuri.

Dacă proba prezintă cheag de fibrină, acesta se prelevă steril şi din el se efectuează cele 3 frotiuri. Bacteriile, dacă sînt prezente, şi celulele se adsorb pe cheag. Restul probei se centrifughează.

(2) Numărarea elementelor celulare se face după agitarea probei. Se foloseşte o celulă de numărat Fuchs-Rosenthal sau Nageotte. La probe cu cheag sau purulente numărarea elementelor nu mai este necesară.

Normal, lichidul-cefalo-rahidian conţine sub 3 elemente/mm^3 (de regulă limfocite). Numărul de leucocite în lcr prezintă o creştere variabilă în funcţie de natura meningitei şi de stadiul evolutiv: pînă la cîteva mii/mm^3 în meningitele acute bacteriene (aspect purulent), între 5o-5oo elemente/mm^3 în meningita tuberculoasă (lichid clar sau opalescent), 5o-1ooo elemente/mm^3 în meningitele virale (lichid clar sau opalescent). In faza precoce a meningitelor bacteriene numărul elementelor în lcr poate fi redus.

In cazul lichidelor clare, numărarea elementelor celulare din probă stabileşte deci dacă este sau nu o meningită.

(3) Examenul direct microscopic

Unul din frotiuri este colorat cu albastru de metilen sau, mai bine, May-Grünwald-Giemsa pentru

examenul citologic. Altul este colorat Gram pentru

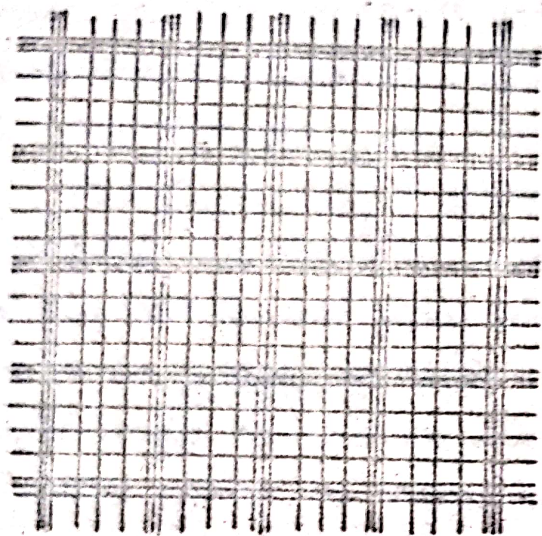


Fig.53 Rețeaua camerei de numărat Fuchs-Rosenthal. Camera Fuchs-Rosenthal are adîncimea de o,2 mm. Rețeaua este formată din 16 pătrate mari, fiecare cu suprafața de 1 mm patrat, delimitate prin linii triple. Pentru numărătoare se folosește un obiectiv 40x. Uzual se numără elementele de pe 4 pătrate mari în diagonală. Se obține un număr N de elemente. Nr.de elemente/mm cub = Nx1,25 (rezultă din Nx5/4).

urmărirea bacteriilor. Al treilea frotiu este păstrat pentru a fi colorat Ziehl-Neelsen sau, mai bine, cu auramină pentru cazurile în care se suspectează infecția tuberculoasă.

Examenul citologic al sedimentului lor orientează diagnosticul meningitei.

(i) Dacă predomină reacția cu polinucleare este vorba, cel mai verosimil, de o meningită bacteriană. Dar și în faza precoce a meningitei tuberculoase sau a meningitelor virale polinuclearele pot predomina.

Frotiul colorat Gram va fi examinat cu cea mai mare atenție pentru a decela eventual prezența bacteriilor. Evidențierea la examenul direct

microscopic a bacteriilor cu caracterele lor morfotinctoriale orientează rapid şi judicios tratamentul antimicrobian, care în meningite este o urgenţă.

Frotiurile din probele de lcr de la bolnavi care au primit antibiotice înainte de recoltarea probei trebuie să fie interpretate cu prudenţă. Pe asemenea frotiuri bacteriile pot să fie reduse ca număr sau chiar absente (în special meningococii şi pneumococii*)), bacteriile gram-pozitive pot să apară gram-negative.

(ii) Dacă predomină reacţia limfocitară poate fi vorba, cel mai verosimil, de o meningită virală sau tuberculoasă.

In cazurile suspecte de tuberculoză, pentru efectuarea frotiului destinat cercetării bacilului tuberculozei, se va proceda astfel: se etalează o picătură din sediment în centrul unei lame noi. După uscare, se suprapune o nouă picătură şi tot aşa de cîteva ori la rînd. In acest mod se realizează o concentrare a bacililor, eventual prezenţi, pe o arie restrînsă. Se colorează Ziehl-Neelsen (cînd este posibil, se preferă coloraţia fluorescentă cu auramină).

(4) Izolarea

Rezultatele examenului direct microscopic sînt numai orientative: de multe ori nu pot fi evidenţi-

*) In asemenea situaţii se poate recurge la o metodă sensibilă de evidenţiere în proba de lcr a antigenelor bacteriene: reacţia de precipitare inelară în capilare sau, mai bine, imunelectroforeza discontinuă contracurent cu seruri specifice.

ate bacteriile şi chiar atunci cînd sînt observate identitatea lor rămîne numai aproximativă. Investigarea probei continuă cu izolarea bacteriei, testarea sensibilităţii faţă de antibiotice şi în final identificarea sa.

(i) Prima zi. O placă cu geloză sînge şi una cu geloză chocolat sînt însămînţate din sediment (pe suprafaţa mediului sînt depuse 1-2 picături separate de inoculum fără a-l dispersa). Plăcile sînt incubate în borcan cu lumînare în atmosferă umedă.

Din proba de lcr necentrifugată se însămînţează: un tub cu bulion glucozat, un tub cu bulion Lewinthal (bulion cu factor X şi V pentru izolarea H.influenzae) şi un tub cu bulion VF cu carne prăjită (cîte 1-1,5 ml/tub).

Culturile se incubează peste noapte la 37°C şi se examinează a doua zi.

(ii) A doua zi

- Pe plăci a apărut o cultură în aria inoculată. Se procedează la antibiogramă şi identificarea bacteriei izolate.

- Pe plăci nu a apărut o cultură. Se reincubează pentru alte 24 ore. Se examinează tuburile cu mediu lichid. Dacă prezintă turbiditate, se fac repicări pe medii adecvate după ce a fost examinat frotiul Gram din tuburile cu creştere.

Dacă atît plăcile cît şi tuburile nu prezintă cultură, sînt reincubate la 37°C cu examinare zilnică pînă la 3 zile. Urmărirea culturilor se face

pînă la 7 zile dacă pacientul a primit antibiotice înainte de recoltarea probei. De fapt, la aceşti pacienţi chiar în lipsa efectului terapeutic procentajul izolărilor scade mult.

In majoritatea meningitelor bacteriene agentul etiologic poate fi izolat dacă proba a fost recoltată înainte de începerea tratamentului antimicrobian.

In cazurile suspecte de meningită tuberculoasă, se va epuiza întreaga cantitate de lcr din cel de al doilea tub prin însămînţare pe mai multe tuburi cu mediu Loewenstein-Jensen şi inoculare intra-peritoneală la cobai. Dacă dispunem de o cantitate mai mare de lcr, se centrifughează 3o min. la 3ooo rpm iar sedimentul va servi la însămînţări şi inoculare.

(5) Examenul biochimic

Se efectuează pe supernatantul rezultat din centrifugarea probei. Se urmăresc modificările apărute ca urmare a

(i) creşterii permeabilităţii barierei hemato-encefalice prin procesul inflamator: creşterea proteinorahiei. In mod normal lcr conţine 15-4o mg proteine la loo ml. In meningitele bacteriene acute sau în cea tuberculoasă proteinorahia este considerabil crescută.(cel mai frecvent peste loo mg%). In meningitele virotice este uşor crescută (de obicei nu depăşeşte loo mg%).

(ii) cultivării bacteriilor în lichidul cefalorahidian. Este caracteristică scăderea glicorahiei în cursul meningitelor bacteriene (inclusiv meningita tuberculoasă) şi menţinerea ei în limite normale (50-70 mg%) în cursul celor virale.

In lcr pot fi evidenţiaţi o serie de metaboliţi bacterieni. De exemplu, acidul lactic în meningitele bacteriene sau alcoolul etilic în cele micotice, ambele substanţe ca metaboliţi finali ai glucozei.

Clorurorahia este scăzută numai în meningita tuberculoasă (normal 0,73 g%).

In concluzie

Examenul direct microscopic (numărarea elementelor celulare, examen citologic, prezenţa, morfologia şi afinitatea tinctorială a bacteriilor din probă) permite în interval de cca o oră orientarea diagnosticului etiologic şi a terapiei antimicrobiene de urgenţă a meningitei.
In absenţa bacteriilor pe frotiu, datele examenului citologic coroborate cu ale celui biochimic vor orienta mai sumar, dar tot atît de repede, diagnosticul.
Izolarea bacteriei infectante şi antibiograma (date care se obţin după minimum 24-48 ore) eventual vor corecta, dacă va fi nevoie, tratamentul antimicrobian deja instituit. Identificarea bacteriei infectante este ultima etapă a diagnosticului.

Tabelul 22

Modificări microbiologice, citologice şi biochimice ale l.c.r. în cursul diferitor meningite

Tipul de meningită	Aspectul l.c.r.	Examen microbiolog.	Examen citologic	Examen biochimic
l.c.r. normal	clar, incolor	steril	0-3 limfocite/mm^3	proteine 15-40 mg% glucoză 50-70 mg% cloruri 730 mg%
Meningite bacteriene acute	opalescent, purulent	se izolează bacteria	polinucleare frecvent peste 500-1000/mm^3	proteine mult ↗↗ glucoză ↘ acid lactic prezent
Meningita tuberculoasă	clar sau uşor opalescent	se izolează b.tuberculozei	limfocite în jur de 200/mm^3	proteine ↗↗ glucoză ↘ cloruri ↘ acid lactic prezent
Meningite micotice	clar sau opalescent	se izolează ciuperca	predomină limfocite 100-500/mm^3	proteine ↗ glucoză ↘ alcool etilic prezent
Meningite virotice	clar sau opalescent	steril bacteriologic se poate izola virusul	limfocite în jur de 500-1000/mm^3	proteine ↗ sau → glucoza normală cloruri normale

29 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR CAILOR URINARE

Infecţia căilor urinare (ICU) este frecventă şi afectează toate grupele de vîrstă şi ambele sexe.

ICU localizate la diferite nivele - uretrite, cistite, pielonefrite -, pot evolua inaparent sau aparent, acut sau cronic.

Prezenţa infecţiei la nivelul căilor urinare se însoţeşte de bacteriurie şi, mai rar, de bacteriemii

Diagnosticul ICU nu poate fi stabilit numai prin examenul clinic:

- multe ICU sînt asimptomatice,
- infecţia lipseşte la cca 46% din pacienţii cu simptomatologie sugestivă pentru ICU.

Demonstrarea bacteriuriei prin urocultură este singura metodă care permite diagnosticul de infecţie a căilor urinare.

Urina vezicală normală este sterilă. Ea se contaminează cu bacteriile de colonizare a uretrei distale şi vulvei, pe care le spală în cursul micţiunii.

Contaminanţii cel mai frecvent izolaţi din

probele de urină recoltate în cursul micţiunii:

Escherichia coli şi bacili coliformi,
Specii de *Proteus*,
Stafilococi coagulazo-negativi,
Enterococi,
Bacili difterimorfi,
Specii de *Neisseria* „nepretenţioase",
Lactobacili,
Levuri,
Specii de *Bacillus*,
Ocazional stafilococi coagulazo-pozitivi,
Ocazional *Pseudomonas aeruginosa*.

După puţine zile de spitalizare în flora uretrei distale şi a vulvei, secundar colonizării colonului, îşi pot face apariţia tulpinile de spital (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, stafilococi coagulazo-pozitivi, bacilul piocianic).

Majoritatea ICU sînt date de *microorganisme saprofite oportuniste* din flora fecală: bacterii şi rareori levuri din flora uretrei distale - *infecţii ascendente*. Mai rar, ICU cu bacterii oportuniste pot rezulta şi prin însămînţare hematogenă sau limfatică cu diferite puncte de plecare (osteomielite, infecţii genitale ş.a.) - *infecţii descendente*.

Microorganismele patogene sînt rareori implicate în etiologia ICU.

Depistarea şi semnificaţia bacteriilor patogene în urină

Bacteriile patogene ajung în căile urinare pe cale hematogenă în cursul unor infecţii sistemice.

Localizarea renală a bacteriilor patogene poate fi o etapă obligatorie (cazul leptospirozelor) sau întîmplătoare (cazul tuberculozei, brucelozei).

In alte infecţii eliminarea prin urină a bacteriei patogene are loc fără ca localizarea renală să fie demonstrată (cazul febrelor tifoidice).

Bacteriile patogene nu găsesc în urină un mediu prielnic pentru înmulţire.

> Bacteriile patogene sînt căutate prin metode speciale de însămînţare şi inoculare (vezi capitolele corespunzătoare din partea a V-a) a sedimentului urinar, metode pe care laboratorul (anterior avizat) le execută numai la indicaţie clinică specială: suspiciune de tuberculoză renală, leptospiroză etc.

Recoltarea urinii pentru diagnosticul tuberculozei renale: se recoltează în totalitate urina de dimineaţă*) în baloane sterile, după o prealabilă toaletă locală (vezi mai jos). Pentru a obţine un volum mai mic de urină, convenabil în prelucrarea ulterioară prin centrifugare a probei, se

*) Contactul prelungit cu urina are efect nociv asupra bacilului tuberculozei. De aceea este contraindicată efectuarea examenului pe urina colectată timp de 24 ore.

indică bolnavului reducerea consumului de lichide în ziua premergătoare recoltării. De asemenea se va suspenda orice administrare de medicamente şi în mod deosebit vitamina C. Administrarea tuberculostaticelor se va întrerupe cu cel puţin o săptămînă înainte.

Pentru a mări şansele de evidenţiere a agentului etiologic în tuberculoza renală, examenul bacteriologic se va face pe 3-4 probe recoltate succesiv la interval de 1-2 zile.

Recoltarea urinii pentru evidenţierea leptospirelor: se face după alcalinizarea urinii prin administrare per os, în ziua precedentă, a 5-1o g citrat de potasiu divizate în 3 doze administrate la mese sub formă de capsule enterice pentru a micşora iritaţia gastrică.

Depistarea şi semnificaţia bacteriilor şi levurilor condiţionat patogene în urină. Urocultura cantitativă

In ordinea frecvenţei bacteriile oportuniste implicate în ICU sînt:

Escherichia coli
Klebsiella, Enterobacter,
Proteus,
Enterococi,
Stafilococi coagulazo-negativi,
Ps.aeruginosa,
Stafilococi coagulazo-pozitivi,
Alte bacterii şi Candida albicans sînt mai rar găsite.

Urina constituie un excelent mediu de cultură în care bacteriile oportuniste infectante se multiplică în intervalul dintre 2 micţiuni pînă la valori mai mari de 100.000 bacterii/ml.)

In urina normală, examinată imediat după recoltarea în cursul micţiunii spontane, bacteriile oportuniste de contaminare nu depăşesc 1000/ml.

> Prezenţa în urină a mai mult de 100.000 bacterii/ml este semnificativă pentru ICU cu bacili gram-negativi intestinali sau enterococi - bacteriurie semnificativă.)

> Diferenţierea certă a bacteriuriei semnificative de bacteriile de contaminare normală a urinii se face numai pe baza aprecierilor cantitative prin examen microscopic direct..), confirmat de urocultura cantitativă, pe probe de urină corect recoltate şi examinate imediat după recoltare.

Aprecierea cantitativă a bacteriilor din urină

Recoltarea urinii pentru examenul bacteriologic

Recoltarea probelor de urină pentru examenul

.) Această cifră corespunde capacităţii de multiplicare în urină a bacililor gram-negativi intestinali, a bacilului piocianic şi enterococilor. Pentru stafilococi viteza de multiplicare în urină este mai redusă iar pentru *Candida* şi mai redusă. De aceea bacteriuria semnificativă pentru ICU cu stafilococi este de 50.000/ml iar pentru cele cu *Candida* de 1000/ml.

..) Există şi alte nenumărate teste de triaj pentru bacteriurie. Cei interesaţi pot consulta bibliografia indicată.

Urina constituie un excelent mediu de cultură în care bacteriile oportuniste infectante se multiplică în intervalul dintre 2 micţiuni pînă la valori mai mari de 100.000 bacterii/ml.*)

In urina normală, examinată imediat după recoltarea în cursul micţiunii spontane, bacteriile oportuniste de contaminare nu depăşesc 1000/ml.

> Prezenţa în urină a mai mult de 100.000 bacterii/ml este semnificativă pentru ICU cu bacili gram-negativi intestinali sau enterococi - bacteriurie semnificativă.*)

> Diferenţierea certă a bacteriuriei semnificative de bacteriile de contaminare normală a urinii se face numai pe baza aprecierilor cantitative prin examen microscopic direct**), confirmat de urocultura cantitativă, pe probe de urină corect recoltate şi examinate imediat după recoltare.

Aprecierea cantitativă a bacteriilor din urină

Recoltarea urinii pentru examenul bacteriologic

Recoltarea probelor de urină pentru examenul

*) Această cifră corespunde capacităţii de multiplicare în urină a bacililor gram-negativi intestinali, a bacilului piocianic şi enterococilor. Pentru stafilococi viteza de multiplicare în urină este mai redusă iar pentru Candida şi mai redusă. De aceea bacteriuria semnificativă pentru ICU cu stafilococi este de 50.000/ml iar pentru cele cu Candida de 1000/ml.

**) Există şi alte nenumărate teste de triaj pentru bacteriurie. Cei interesaţi pot consulta bibliografia indicată.

bacteriologic se face în recipiente sterile cu gura largă (diametrul de minimum 5 cm): borcane de miere, de exemplu.

Recoltarea se face la minimum 3 ore de la micţiunea anterioară, pentru a lăsa organismului infectant timpul necesar multiplicării în urina vezicală pînă la valori care să-l diferenţieze uşor de bacteriile de contaminare.

Proba de urină pentru examenul bacteriologic se recoltează din jetul mijlociu în cursul micţiunii spontane după toaletă îngrijită a organelor genitale. Asupra acestor amănunte pacientul este instruit în prealabil. De multe ori se impune intervenţia directă a surorii.

La femeie se spală regiunea vulvară şi orificiul vaginal cu apă şi săpun, se clăteşte din abundenţă cu apă fiartă şi în final se usucă cu grijă folosind un prosop steril. Pacienta urinează cu labiile depărtate şi prinde în borcan jetul mijlociu de urină, cu grija să nu atingă gura borcanului de piele sau lenjerie.

La pacientele cu scurgeri vaginale trebuie să intervină sora care pregăteşte de aceeaşi manieră regiunea vulvară şi orificiul vaginal şi în final introduce în vagin un tampon de vată. In acest sens, menţionăm că o probă de loo ml urină normală contaminată cu numai 1 ml scurgere vaginală infectată prezintă în urocultura cantitativă lo^6 bacterii/ml, ceea ce falsifică evident rezultatele examenului.

La bărbat se retractă prepuţul şi se spală de manieră similară glandul şi meatul urinar după care se usucă cu grijă regiunea.

La pacienţii cu infecţii prostatice contaminarea probei cu bacteriile de la acest nivel este inevitabilă. Pentru stabilirea sediului infecţiei în aceste cazuri se recurge la recoltarea de probe seriate.

Recolta seriată: proba 1 - primii 1o ml de urină eliminaţi; proba 2 - jetul mijlociu (după cca 2oo ml urină de spălare); masaj prostatic; proba 3 - secreţie prostatică; proba 4 - primul jet de 1o ml urină după masaj. Se face imediat numărătoarea bacteriilor în fiecare probă.

Procedura de recoltare trebuie adaptată după caz - scopul examenului, starea pacientului, vîrstă ş.a.

Recoltarea la gravide în cadrul consultului prenatal (depistarea activă a infecţiei urinare).

Faţă de numărul mare de paciente este practic imposibil a se recurge sistematic la metoda standard de recoltare. Pacientei i se înmînează borcanul şi este instruită asupra modului de recoltare a jetului mijlociu. Pacienta urinează fără alte pregătiri într-un WC care are asigurat un minimum de condiţii igienice. Probele sînt supuse apoi imediat triajului bacteriologic (vezi nota **) de la subsolul paginii 291). De la pacientele la care triajul a evidenţiat o bacteriurie semnificativă, se recoltează şi se examinează după procedeul standard (urocultură cantitativă) o nouă probă de urină.

Recoltarea de la pacientele imobilizate la pat se face de către soră. După toaleta organelor genitale pacienta urinează pe bazinet. Sora reţine jetul mijlociu. Paciente-

le care urinează dificil în poziție culcată vor fi ridicate și sprijinite în șezut în pat sau la marginea patului pe un mic taburet. Dacă procedînd de această manieră nu se poate obține o probă satisfăcătoare, se recurge la puncția suprapubiană.

Recoltarea de la copii

Recoltarea corectă de la copii prea mici pentru a putea coopera este dificilă. Se face toaleta organelor genitale. Pentru a preîntîmpina contaminarea probei cu bacterii din regiunea anală, în jurul penisului sau a vulvei se fixează orificiul unei pungi sterile din material plastic de mărime adecvată vîrstei copilului. In lipsa unui asemenea dispozitiv, recoltarea se face într-un flacon cu gura largă. Trebuie pîndit momentul micțiunii pentru a putea „prinde" proba. Micțiunea la copilul mic putînd fi declanșată de stimuli externi, recoltarea probei de urină se va face înainte de a supune copilul altor manipulări: cîntărire, injecții ș.a.

Recoltarea prin puncție suprapubiană .

Recoltarea urinii prin cateterism trebuie evitată ori de cîte ori este posibil, chiar la femeie, din cauza riscului însămînțării bacteriene a vezicii. Cateterismul în condițiile colonizării colonului și uretrei anterioare cu tulpini bacteriene de spital expune pacientul riscului unor infecții foarte greu de tratat.

Ca metodă alternativă cateterizării, pentru obținerea unui eșantion necontaminat, a fost propusă aspirația prin puncție suprapubiană. Manevra este ușor suportată de pacient și îl supune la mai puține riscuri.

Pacientul este pregătit ca pentru o incizie chirurgicală. Puncția se face suprapubian, pe linia mediană, după anestezie locală. In prealabil pacientul este bine hidratat și instructat să nu urineze, astfel încît vezica să fie palpabilă în momentul procedurii.

Recoltarea prin puncție suprapubiană nu este posibilă la pacienții cu capacitate vezicală redusă sau la cei cu polakiurie.

De la pacienții cu polakiurie se recoltează urina emisă spontan. Recoltarea din jet mijlociu poate să nu fie

posibilă şi nici nu este necesară: însăşi frecvenţa micţiunilor realizează îndepărtarea contaminanţilor uretrei.

Probele de urină sînt transportate în cel mai scurt timp la laborator. Dacă un interval mai mare de o oră este inevitabil între recoltare şi examinare, proba se refrigerează imediat la 4°C iar transportul se face în condiţii de refrigerare. Examenul probelor refrigerate nu va întîrzia mai mult de cîteva ore de la recoltare. In buletinul de trimitere a probei este obligatorie consemnarea orei recoltei.

> In concluzie
>
> Nici un laborator şi nici o tehnică de laborator nu poate da un rezultat corect pe o probă de urină neîngrijit recoltată şi necorespunzător transportată sau neexaminată în timp util.

Examenul direct microscopic şi valoarea sa

Din proba de urină necentrifugată - cel mai bine imediat după recoltare - se efectuează cu ansa cu buclă de 4 mm diametru un frotiu. Se usucă, se fixează, se colorează Gram şi se examinează la microscop cu imersia (90x). Prezenţa a minimum o bacterie în majoritatea cîmpurilor examinate semnifică cu certitudine de 85-90% bacteriuria mai mare de 100.000/ml.

> Examenul microscopic al frotiului gram din urina proaspăt recoltată şi necentrifugată este cea mai simplă metodă, suficient de sensibilă, pentru detectarea bacteriuriei semnificative. Este la îndemîna oricărui medic care dispune de microscop şi cunoştinţele necesare. Orientează diagnosticul în interval de cîteva minute.

<u>Urocultura cantitativă</u>

1. Din proba de urină <u>necentrifugată</u> se efectuează 3 diluţii decimale după cum urmează:

10^{-1} = 9 ml ser fiziologic + 1 ml urină,

10^{-2} = 9 ml ser fiziologic + 1 ml din diluţia 10^{-1},

10^{-3} = 9 ml ser fiziologic + 1 ml din diluţia 10^{-2}.

Pentru fiecare diluţie se utilizează cîte o pipetă gradată de 1 ml. După fiecare pipetare tuburile cu diluţii se agită foarte bine.

2. Din fiecare diluţie se pipetează 1 ml în cîte o placă Petri sterilă şi marcată.

3. Imediat, în fiecare placă se toarnă 2o ml geloză nutritivă topită şi răcită la 50°C. Se agită plăcile pentru uniformizare.

4. După solidificarea mediului plăcile sînt incubate peste noapte la 37°C.

5. A doua zi se numără coloniile de pe plăcile cu mai mult de 3o colonii şi mai puţin de 3oo.

Dacă nu a apărut o cultură, plăcile se reincubează pînă la 48 ore înainte de a se raporta un rezultat negativ.

$$\text{Nr.bacterii/ml urină} = \frac{\text{Nr. colonii}}{\text{de pe placă}} \times \text{diluţia}$$

<u>Interpretarea rezultatelor</u> uroculturii cantitative.

Prezenţa a mai mult de 10^5 bacterii/ml urină într-o singură probă din jet mijlociu semnifică existenţa ICU cu o certitudine de 80% Repetarea rezultatului pe o a doua şi a treia probă consecutivă creşte această certitudine respectiv la 90 şi 100%

Prezenţa a mai puţin de 10.000 bacterii/ml urină din jet mijlociu ţine de contaminarea probei.

Prezenţa a 10^4-10^5 bacili gram-negativi/ml urină poate fi urmarea ICU. Repetarea uroculturii va confirma sau va infirma aceasta. Bacteriuriile de acest ordin de mărime cu stafilococ sau *Candida* sînt semnificative.)

Pentru probele de urină recoltate prin puncţie suprapubiană simpla prezenţă a bacteriilor este semnificativă pentru ICU.

Creşterea diurezei la pacienţii cu ICU sau administrarea de substanţe antimicrobiene cu eliminare urinară scad numărul de bacterii/ml de urină. Este un aspect de care trebuie să se ţină seama în interpretarea rezultatelor uroculturii cantitative.

Intrepretarea examenului bacteriologic cantitativ pe

.) Vezi nota .) de la subsolul paginii 291.

probe seriate pentru localizarea infecţiei la nivelul căilor urinare inferioare (uretră, vezică, prostată).

Numărul bacteriilor/ml în proba 1 > decît în proba 4, cu proba 2 sterilă = uretrită; numărul bacteriilor/ml în probele 3 şi 4 > decît în proba 1 = prostatită; numărul bacteriilor/ml în proba 3 > decît în proba 4 = prostatită cronică. Pentru identificarea prostatitei atunci cînd proba 2 este pozitivă se administrează 2-3 zile antibioterapie activă în urină după care se face o nouă recoltă seriată.

In ordinea frecvenţei, prostatitele sînt determinate de bacili gram-negativi, în special colibacili, gonococ, Candida, Trichomonas.

Examenele bacteriologic şi seroimunologic sînt indispensabile pentru stabilirea localizării sediului infecţiei la nivelul căilor urinare (uretrită, prostatită, cistită, pielonefrită). Celor interesaţi asupra acestor amănunte le recomandăm, din bibliografia capitolului, revista literaturii făcută de Duca şi Buiuc (1976).

./.

30 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR CAILOR RESPIRATORII SUPERIOARE

Infecţiile căilor respiratorii superioare (rinite, angine, laringite) sînt determinate cel mai frecvent de virusuri. Infecţiile bacteriene la aceste nivele evoluează ca infecţii primare sau ca infecţii secundare infecţiilor virale sau altor condiţii care scad rezistenţa antiinfecţioasă a organismului (prematuri, nou născuţi, boli de sînge, iritaţii chimice, deshidratare excesivă a mucoaselor ş.a.) Infecţiile micotice (candidoze) evoluează ca infecţii secundare.

Dintre infecţiile bacteriene primare, pe primul loc, ca frecvenţă şi importanţă a complicaţiilor postinfecţioase, se situează anginele determinate de Streptococcus pyogenes.

Toxiinfecţia difterică, frecventă altădată, astăzi este rară. Epiglotita acută determinată de Haemophilus influenzae este o infecţie bacteriemică a copilului mic (6 luni-2 ani).

Infecţiile secundare ale căilor respiratorii superioare şi cavităţii bucale sînt determinate de unii saprofiţi şi comensali oportunişti ai acestor mucoase.

Examenul bacteriologic al exsudatului faringian se efectuează în scopul

(i) diagnosticării anginelor streptococice şi altor angine bacteriene sau micotice care, spre deosebire de cele virale, beneficiază de antibioterapie;

(ii) stabilirii porţii de intrare în toxiinfecţii cum sînt scarlatina şi difteria;

(iii) depistării focarului infecţios în reumatismul articular acut şi glomerulonefrita difuză acută;

(iv) depistării purtătorilor de S.pyogenes, stafilococ auriu şi bacil difteric.

Examenul bacteriologic al exsudatului nazofaringian se efectuează în scopul

(i) izolării meningococului, pneumococului, H.influenzae, bacterii care se găsesc mai frecvent la acest nivel decît în nas şi faringe;

(ii) diagnosticării unor infecţii din vecinătate cum sînt infecţiile bronho-pulmonare la pacienţi care nu expectorează (copilul mic) (vezi capitolul 31, p. 316).

Examenul bacteriologic al exsudatului nazal (nări) se efectuează în scopul depistării purtătorilor de stafilococ auriu şi S.pyogenes.

Normal, mucoasele nazală, nazo-faringiană, faringiană și bucală sînt populate de un număr considerabil de microorganisme aparținînd unor diverse specii saprofite și comensale, anaerobe și aerobe (fig.54).

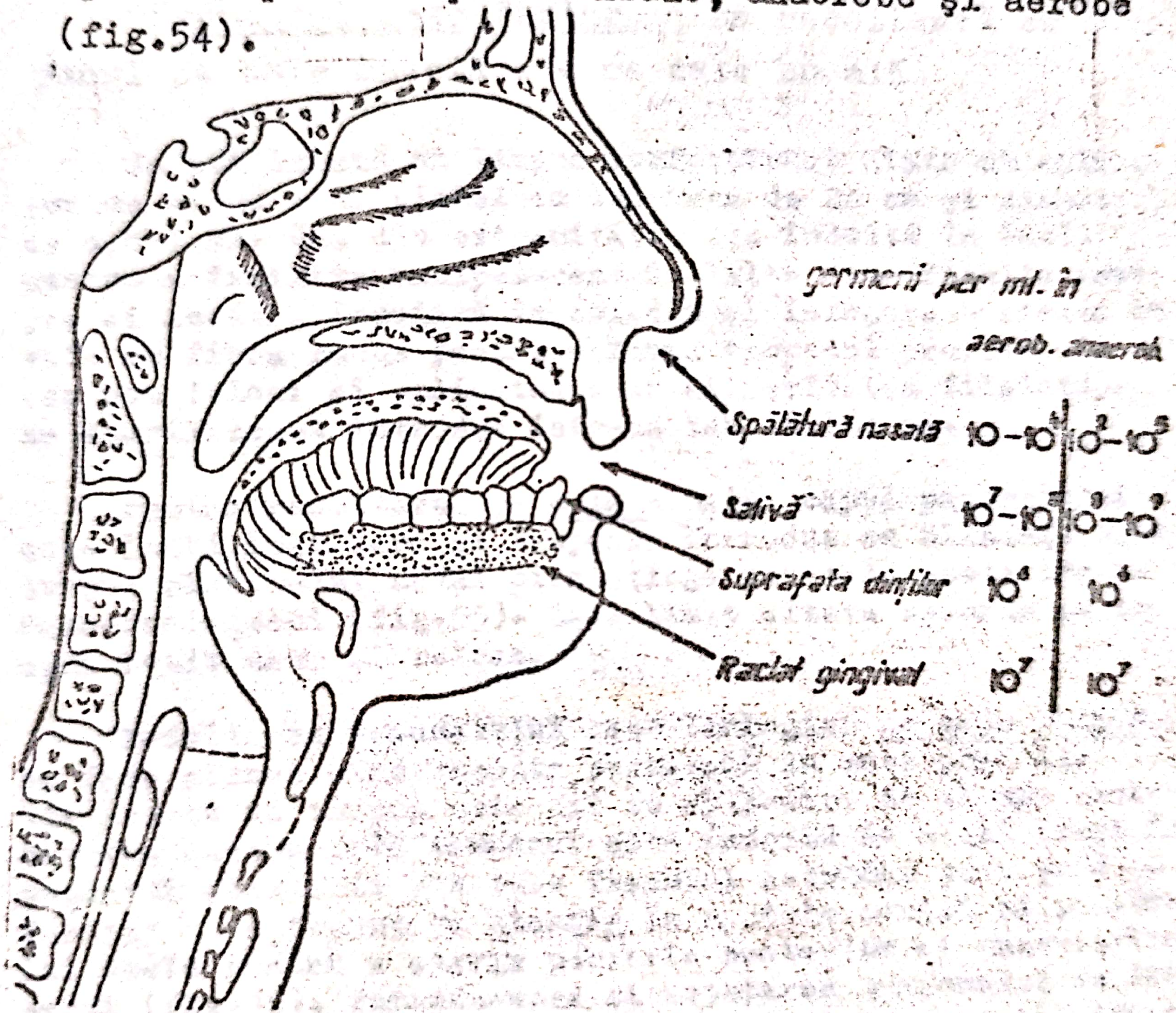


Fig.54 Căile aeriene superioare (secțiune schematică). Reprezentare sugestivă pentru densitatea populării normale a acestor mucoase cu bacterii și fungi (după Rosebury, 1962)

Unele dintre aceste specii comensale nu au putut fi implicate în infecţii ale căilor respiratorii superioare:

Streptococii α-hemolitici,
Staphylococcus epidermidis,
Neisseria „nepretenţioase",
Veillonella,
Bacili difterimorfi.

Specii comensale pentru care a fost dovedită implicarea în infecţii ale căilor respiratorii superioare

Staphylococcus aureus,
Haemophylus influenzae,
Klebsiella şi alţi coliformi,
Pneumococi,
Candida albicans.

Recoltarea şi transportul probelor

Pentru un examen bacteriologic concludent al exsudatelor faringian şi nazo-faringian recoltarea probelor trebuie făcută înainte de administrarea oricărui tratament antimicrobian.

Exsudatul faringian se recoltează cu tamponul. Faringele trebuie bine expus şi iluminat: pacientul ţine gura larg deschisă, limba este apăsată şi imobilizată cu apăsătorul de limbă. Se şterg cu tamponul ferm, fără a brusca, ambele amigdale, peretele posterior al faringelui şi orice arie congestivă, cu exsudat purulent, cu false membrane sau ulceraţii Atît la introducerea cît şi la retragerea tamponului

trebuie atenţie pentru a nu-l atinge de limbă sau contamina cu salivă.

Exsudatul nazo-faringian se recoltează cu tamponul pe cale nazală sau pe cale bucală.

Se utilizează un tampon confecţionat dintr-un aplicator de sîrmă crom-nichel cu lungimea de 2o cm şi diametrul de o,8-1 mm. Una din extremităţi este îndoită în buclă pentru a facilita manipularea. Cealaltă este îndoită asupra ei însăşi, înmuiată în colodiu şi înfăşurată strîns cu vată cu fibra lunga pentru a forma tamponul propriu-zis (se pot folosi şi aplicatoare cu extremitatea filetată). Se sterilizează introdus într-un tub 16x16o mm.

Pentru recoltarea pe cale nazală capul pacientului este imobilizat ferm şi tamponul introdus cu blîndeţe de-a lungul planşeului nazal pînă atinge peretele posterior al nazo-faringelui (fig.55). Este lăsat cîteva secunde pe loc, apoi rotit uşor şi retras.

Recoltarea exsudatului nazo-faringian pe cale bucală se face atunci cînd recolta pernazală nu este posibilă. Se utilizează un tampon obişnuit cu aplicator de sîrmă. Extremitatea care poartă tamponul este îndoită în unghi drept în momentul scoaterii din tub. Tamponul introdus prin gură în faringe este trecut cu atenţie în spatele uvulei şi palatului moale pentru a şterge peretele posterior al nazo-faringelui (fig.55). Introducerea şi scoaterea tamponului se fac cu atenţie pentru a nu contamina tamponul cu secreţii bucale şi faringiene.

Pentru recoltarea exsudatului nazal tamponul umectat cu ser fiziologic este introdus, pe rînd, în cîte o nară pe o distanţă de 2-3 cm şi şterge mucoasa prin rotire blîndă.

Imediat după recoltare tampoanele sînt introduse în tub şi expediate la laborator. Examinarea trebuie făcută în interval de 1 oră de la recoltare.

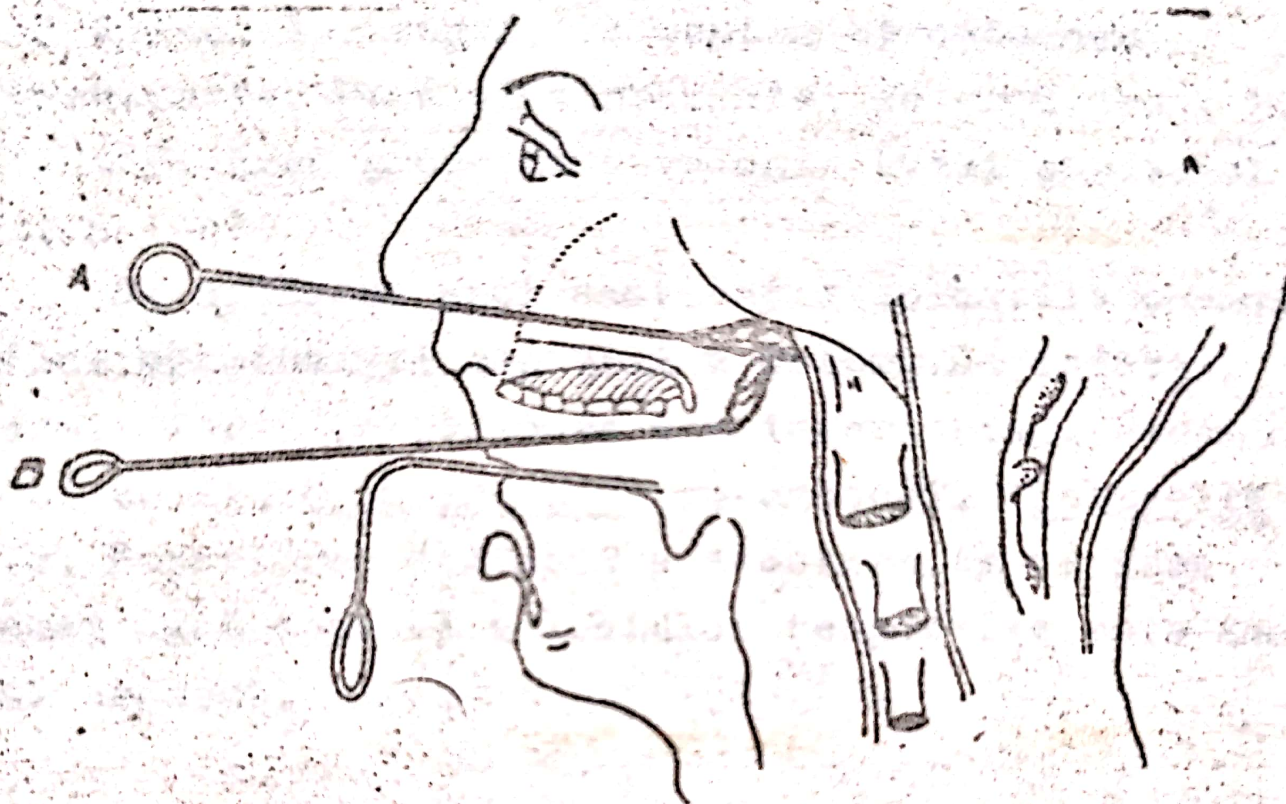


Fig.55 Recoltarea exsudatului nazo-faringian. A-pe cale nazală; B-pe cale bucală (schematic)

Dacă acest interval nu poate fi respectat, tamponul se introduce în mediu de transport (vezi capitolul 24, p.241) şi refrigerat.

Pentru izolarea meningococilor, bacterii sensibile la rece, la deshidratare, la variaţiile de pH, la concurenţa florei de asociaţie, dezideratul ma-

major este însămînţarea probelor cît mai curînd posibil după recoltare.

Buletinul de trimitere a probelor trebuie să consemneze în termeni precişi bacteria patogenă care se urmăreşte (streptococ β-hemolitic, meningococ, bacil difteric ş.a.) precum şi diagnosticul clinic. Intr-un fel va fi condus examenul exsudatului faringian şi nazo-faringian la un copil cu angină şi în altul la un copil cu pneumonie.

Examenul bacteriologic de rutină al exsudatului faringian şi nazo-faringian. Diagnosticul anginelor streptococice.

Pentru diagnosticul anginelor streptococice examenul direct microscopic al exsudatului faringian nu are nici o valoare: streptococii comensali sînt similari morfo-tinctorial cu S.pyogenes.

Cultura

Prima zi. Tamponul este epuizat pe o placă cu geloză-sînge*) care se incubează peste noapte la 37°C

*) Insămînţarea exsudatului faringian în placă turnată permite reperarea mai facilă a coloniilor de S.pyogenes care nu produc streptolizină S. In condiţii de anaerobioză, fie şi relativă, aceste tulpini formează colonii β-hemolitice, pe cînd după incubarea aerobă formează colonii α-hemolitice sau cu hemoliză parţială.

în borcan cu lumînare.

A doua zi. Se examinează cu atenţie plăcile în lumină transmisă şi în lumină reflectată, cu ochiul liber şi cu lupa de mînă.

In primul rînd se urmăreşte prezenţa şi numărul coloniilor sugestive pentru streptococul β-hemolitic. Dacă sînt prezente, se procedează la identificarea grupului serologic (vezi capitolul 11, p.146).

Se urmăresc apoi cantitativ coloniile comensalilor oportunişti capabili a determina infecţii respiratorii (superioare sau inferioare): stafilococi aurii, H.influenzae, pneumococi, Klebsiella ş.a. Raportarea nominală a acestora se va face numai dacă numărul coloniilor respective este anormal crescut.

Pentru raportarea rezultatelor recomandăm următorii termeni:

(i) prezent streptococ β-hemolitic grup A (dacă s-a făcut determinarea grupului): numeroase colonii sau cîteva colonii, după caz;

(ii) floră bacteriană normală;

(iii) floră normală cu numeroase colonii de... (sau chiar cultură pură, cum este uneori în cazul stafilococului auriu)...... (urmează nominalizarea comensalului oportunist recunoscut capabil a da infecţii respiratorii: stafilococ coagulazo-pozitiv, pneumococ etc.etc.).

Insistăm asupra termenului de „floră normală" şi nu opiniem pentru nominalizarea speciilor respective (streptococ viridans sau streptococi α-hemolitici, neisserii „nepretenţioase" ş.a.) deoarece poate fi o sursă de interpretări eronate, din partea celor neavizaţi, dăunătoare pentru pacient.

> La pacienţii trataţi cu antibiotice, bacilii gram-negativi, eventual stafilococii şi Candida, devin predominanţi*) în flora mucoaselor căilor aeriene superioare. De aceea, la aceşti pacienţi interpretarea rezultatelor examenului bacteriologic al exsudatului faringian şi nazo-faringian nu poate fi făcută corect.

Pentru izolarea H.influenzae se va epuiza tamponul pe o placă cu geloză-sînge de cal sau iepure. In lipsă, se poate utiliza şi geloza cu sînge de berbec cu strie de stafilococ auriu după epuizarea probei.

Pentru izolarea meningococului epuizarea tamponului nazo-faringian se va face pe placă proaspăt turnată iar pe suprafaţa însămînţată se vor depune rondele cu lincomicină, colimicină sau polimixină B,

---

*) La pacienţii cu infecţii virale, ca şi la indivizii normali, flora aerobă predominantă a faringelui sau naso-faringelui este reprezentată de streptococi viridans şi neisserii „nepretenţioase".

antibiotice care inhibă selectiv flora de asociaţie. Coloniile de meningococ vor fi căutate în vecinătatea rondelelor cu antibiotic. Identificarea lor se face pe baza caracterelor menţionate în capitolul 12, p.157).

Meningococul este căutat în exsudatul nazo-faringian la bolnavi cu meningococcemii şi meningită cerebro-spinală epidemică ca şi pentru depistarea purtătorilor sănătoşi.

Confirmarea bacteriologică a anginei difterice

Diagnosticul clinic este cel care dictează terapia specifică în difterie. Laboratorul de bacteriologie nu face decît să confirme sau să infirme acest diagnostic într-un interval în care actul terapeutic este deja consumat.

Se recoltează 2 tampoane de la nivelul falsei membrane.

Prima zi. Unul din tampoane se însămînţează pe o placă cu mediu Tinsdale (mediu selectiv cu telurit de potasiu) şi pe o placă cu geloză sînge.

Insămînţarea pe geloză sînge se impune din 2 motive:

- Controlează calitatea recoltei. Dacă pe mediu selectiv nu apare cultura nu se poate şti dacă aceasta se datorează absenţei patogenilor sau absenţei bacteriilor ca urmare a unei recolte necorespunzătoare. Dacă lipseşte cultura şi pe placa cu geloză sînge, atunci recolta este necorespunzătoare.
- Unele angine cu S.pyogenes pot simula difteria. In acest caz placa cu geloză sînge lămureşte diagnosticul, ceea ce nu poate să facă mediul selectiv cu telurit de potasiu.

După însămînţarea plăcilor tamponul poate fi folosit pentru efectuarea unui frotiu care se examinează după colorarea cu albastru de metilen. Are numai valoare prezumtivă,

deoarece morfologic bacilul difteric nu poate fi diferenţiat cu certitudine de bacilii difterimorfi normal prezenţi la acest nivel.

Al doilea tampon este însămînţat în mediu de îmbogăţire OCST (ou-cistină-telurit de potasiu).

Mediile însămînţate se incubează peste noapte la 37°C.

<u>A doua zi.</u>

Pe mediul Tinsdale

- sînt prezente colonii negre cu halou negru. Coloniile suspecte sînt repicate pe mediu Loeffler şi într-un tub cu bulion infuzie. In seara aceleeaşi zile poate fi făcut un frotiu din cultura pe mediu Loeffler.
- Coloniile negre cu halou negru lipsesc. Se reincubează plăcile pentru alte 24 ore. Se face repicarea de pe mediul de îmbogăţire pe mediul Tinsdale şi se urmăreşte în acelaşi mod.

<u>A treia zi.</u> Se controlează microscopic puritatea culturii pe mediul Loeffler şi se repică pe mediul Hiss pentru cercetarea reacţiilor fermentative.

<u>A patra zi.</u> Dacă frotiul a atestat puritatea culturii iar reacţiile fermentative prezenţa bacilului difteric, se procedează la testarea toxigenezei *in vivo* folosind cultura de 48 ore în bulion infuzie (vezi capitolul 16, pp. 193-195) sau *in vitro* folosind cultura pe mediul Loeffler (vezi capitolul 6, pp.89-90).

<u>Diagnosticul infecţiei Vincent</u>

Această infecţie evoluează cu leziuni pseudomembranoase sau ulcero-necrotice la nivelul gurii sau faringelui. Este determinată de o asociaţie sinergică între <u>Borrelia vincenti</u> şi <u>Fusobacterium fusiforme</u>, un bacil anaerob, gram-negativ, cu capetele efilate.

Cu tamponul recoltat la nivelul leziunii se efectuează un frotiu care se colorează gram. <u>B.vincenti</u> şi <u>F.fusiforme</u> sînt prezenţi şi în gura indi-

vizilor normali. De aceea, prezența în frotiu a numeroase spirochete și bacili fuziformi gram-negativi are valoare diagnostică numai în contextul clinic sugestiv pentru angina sau stomatita Vincent.

./.

31 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR CAILOR RESPIRATORII INFERIOARE. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SPUTEI.

Infecţiile căilor respiratorii inferioare sînt determinate de virusuri, bacterii, fungi sau protozoare. Infecţia bacteriană evoluează frecvent ca o complicaţie a infecţiilor virale.

Cînd focarul infecţios evoluează în lumenul bronşic sau alveolar (bronşite acute, pneumonii şi bronho-pneumonii) microbul infectant este prezent şi poate fi evidenţiat în exsudatul bronşic.

In cazul focarelor infecţioase cu evoluţie interstiţială (tuberculoză pulmonară, abcese pulmonare), microbul infectant apare în secreţia bronşică numai după deschiderea focarului infecţios în lumenul bronşic.

Pneumoniile bacteriene acute sînt infecţii bacteriemice: bacteria infectantă poate fi izolată în hemocultură în cursul primelor zile de boală. - Persistenţa hemoculturilor pozitive pe parcursul evoluţiei pneumoniei indică un prognostic grav. - Pneumoniile se pot complica cu empieme pleurale: bacteria infectantă este prezentă şi poate fi evidenţiată în exsudatul pleural.

Scanned with OKEN Scanner

Sputa este reprezentată de secreţiile traheo-bronşice expectorate în cursul unui acces de tuse.

Acumularea de secreţii bronşice şi expectoraţia nu sînt apanajul exclusiv al infecţiilor bronho-pulmonare. Ele apar şi în alte circumstanţe patologice:

(i) afecţiuni alergice ale căilor respiratorii,

(ii) inhalare cronică de gaze iritante, pulberi, fumat ş.a.

Mucoasa bronşică normală este sterilă.

Sputa însă este un produs patologic care se contaminează întotdeauna cu microbiota gîtului (nazo-faringe, faringe, tonsile) şi gurii (cavitatea bucală, dinţii, limba, gingiile, saliva) (fig. 54).

Nici aspiraţia prin bronhoscop nu protejează exsudatul bronşic de contaminarea cu flora cavităţii bucale şi faringelui.

Numai aspiraţia traheo-bronşică prin puncţie subglotică furnizează un eşantion de secreţie bronşică necontaminat.

Flora de contaminare normală a sputei include constant:

Streptococi viridans,

Neisseria „nepretenţioase",

Branhamella catarrhalis,

Stafilococi ;

variabil şi în cantităţi reduse:

Pneumococi (de obicei R - cca 25% din indivizii normali sînt purtători bucali sau faringieni),

Haemophilus influenzae, H.parainfluenzae, H.haemolyticus, H.parahaemoliticus,

Streptococcus pyogenes (cca 5-20% din indivizii normali sînt purtători faringieni) şi streptococi β-hemolitici grup C,

Enterococi,

Enterobacteriaceae (cel mai frecvent Escherichia coli şi Klebsiella),

Candida albicans,

Anaerobi nesporulaţi (coci gram-pozitivi şi negativi, bacili gram-pozitivi şi negativi, spirili).

La pacienţii trataţi cu antibiotice contaminarea sputei cu bacili gram-negativi, stafilococ auriu şi C.albicans poate să fie mai importantă ca urmare a predominanţei acestor bacterii pe mucoasa căilor respiratorii superioare.

Infecţiile bronho-pulmonare bacteriene sînt cauzate

(i) cel mai frecvent de saprofiţi şi comensali oportunişti ai căilor aeriene superioare

- Pneumococi,
- Klebsiella pneumoniae,
- H.influenzae,
- Staphylococcus aureus,
- Escherichia coli,
- Proteus,
- Pseudomonas aeruginosa,
- Mycoplasma pneumoniae ş.a.

(ii) <u>mai rar de bacterii patogene</u>

- pentru care există purtători sănătoşi nazo-faringieni (contaminanţi virtuali ai probelor de spută):

<u>Streptococcus pyogenes</u>

- pentru care nu exsită purtători sănătoşi,

<u>Bordetella pertussis</u>,

<u>Mycobacterium tuberculosis</u>,

foarte rar

<u>Bacillus anthracis</u>,

<u>Yersinia pestis</u> ş.a.

Pentru diagnosticul etiologic al infecţiilor bronho-pulmonare trebuie examinat bacteriologic <u>exsudatul bronşic</u>.

In pneumoniile bacteriene acute <u>hemocultura</u> practicată în primele zile de boală este foarte utilă*). De asemenea, examenul bacteriologic al <u>exsudatului pleural</u> dacă acesta există.

<u>Resoltarea si transportul probelor</u>

Recoltarea probelor pentru diagnosticul infecţiilor căilor respiratorii inferioare trebuie făcută înaintea administrării tratamentului antimicrobian.

*) La 25-30% din pacienţii cu pneumonie pneumococică, pneumococul este izolat în hemocultură. La mulţi pacienţi pneumococul a fost izolat din sînge şi nu a putut fi izolat din spută.

Recoltarea sputei

Este esențial ca proba recoltată să conțină exsudat traheo-bronșic și nu numai salivă sau salivă și mucus nazo-faringian. Pentru aceasta trebuie să se asigure cooperarea bolnavului instruit odată cu înmînarea vasului pentru recoltă. Prea des încă sora lasă la capul bolnavului borcanul și se rezumă să-i spună „scuipă după ce tușești" fără a-i explica ce înseamnă a expectora sau ce înseamnă sputa.

Se folosesc borcane sterile de 100-500 ml.

O probă de 1-3 ml este suficientă.

Pentru a reduce contaminarea probei, recoltarea trebuie să se facă după clătirea gurii și gargară cu apă fiartă și răcită.

La pacienții cu tuse productivă, care expectorează cantități apreciabile, este suficientă recolta după un acces de tuse. Cel mai indicat este ca acești pacienți să expectoreze în fața medicului sau a sorei.

La pacienții cu tuse slab productivă contaminarea probei este considerabilă. Proba se recoltează dimineața la deșteptare (exsudatul bronșic acumulat peste noapte). La acești pacienți se poate încerca stimularea secrețiilor bronșice prin aerosolizare cu soluție salină hipertonică caldă.)

.) In aceste cazuri o atenție deosebită trebuie dată sterilizării aparaturii de aerosolizare pentru a evita infecțiile iatrogene.

La copii, care nu expectorează, se încearcă recoltarea unei probe de exsudat nazo-faringian (vezi capitolul 3o, p.3oo şi 3o3 şi în capitolul de faţă p. 317). Această probă reflectă însă şi mai puţin fidel decît sputa flora secreţiilor bronşice. Rezultate mai bune dă recoltarea pe tampon laringian a exsudatului bronşic proiectat în cursul tusei pînă la acest nivel.

<u>Tamponul laringian</u> este confecţionat dintr-un aplicator de sîrmă de aluminiu cu diametrul de 2 mm, cudat în unghi de 120° la 4-5 cm de extremitatea care suportă tamponul. Se sterilizează introdus într-un tub de 18x3o mm. Pentru recoltare: se umectează tamponul cu apă peptonată; limba este imobilizată cu apăsătorul de limbă; sub controlul oglinzii laringiene tamponul este introdus peste baza limbii. Cînd partea lungă a aplicatorului stă de-a lungul limbii, tamponul este în laringe. Dacă în acest moment pacientul este stimulat să tuşească, secreţii din trahee şi laringe se depun pe tampon.

La bolnavii inconştienţi sau cu dureri toracice mari, care nu tuşesc se recurge la aspirarea secreţiilor bronşice cu un cateter cu diametru redus introdus printr-un ac cu care s-a puncţionat ligamentul cricoidian.

Pentru <u>diagnosticul cazurilor suspecte de tuse convulsivă</u> se recurge la examenul exsudatului nazo-faringian. Tamponul introdus în nazo-faringe pe cale nazală este lăsat pe loc pe parcursul cîtorva accese de tuse provocată.

La pacienţii la care nu se reuşeşte recoltarea pe tampon se plasează la 1o cm de gură o placă cu mediu Bordet-Gengou descoperită în cursul unui acces de tuse. Rezultatele sînt mai slabe decît în cazul recoltării pe tampon.

La copii, care nu expectorează, se încearcă recoltarea unei probe de exsudat nazo-faringian (vezi capitolul 3o, p.3oo şi 3o3 şi în capitolul de faţă p. 317). Această probă reflectă însă şi mai puţin fidel decît spută flora secreţiilor bronşice. Rezultate mai bune dă recoltarea pe tampon laringian a exsudatului bronşic proiectat în cursul tusei pînă la acest nivel.

<u>Tamponul laringian</u> este confecţionat dintr-un aplicator de sîrmă de aluminiu cu diametrul de 2 mm, cudat în unghi de 120° la 4-5 cm de extremitatea care suportă tamponul. Se sterilizează introdus într-un tub de 18ox3o mm. Pentru recoltare: se umectează tamponul cu apă peptonată; limba este imobilizată cu apăsătorul de limbă; sub controlul oglinzii laringiene tamponul este introdus peste baza limbii. Cînd partea lungă a aplicatorului stă de-a lungul limbii, tamponul este în laringe. Dacă în acest moment pacientul este stimulat să tuşească, secreţii din trahee şi laringe se depun pe tampon.

La bolnavii inconştienţi sau cu dureri toracice mari, care nu tuşesc se recurge la aspirarea secreţiilor bronşice cu un cateter cu diametru redus introdus printr-un ac cu care s-a puncţionat ligamentul cricoidian.

Pentru <u>diagnosticul cazurilor suspecte de tuse convulsivă</u> se recurge la examenul exsudatului nazo-faringian. Tamponul introdus în nazo-faringe pe cale nazală este lăsat pe loc pe parcursul cîtorva accese de tuse provocată.

La pacienţii la care nu se reuşeşte recoltarea pe tampon se plasează la 1o cm de gură o placă cu mediu Bordet-Gengou descoperită în cursul unui acces de tuse. Rezultatele sînt mai slabe decît în cazul recoltării pe tampon.

Pentru diagnosticul bacteriologic al tuberculozei pulmonare se recoltează cîte o probă de spută matinală în 3 zile consecutiv. Probele se trimit laboratorului imediat după recoltare.

La pacienţii care nu expectorează (copii ş.a.), se recoltează cîte un tampon laringian în 3 zile consecutiv sau, în condiţii de spitalizare, se recoltează spălătura gastrică*)

La pacienţii cu tuse slab productivă se poate încerca stimularea secreţiilor bronşice prin aerosolizare cu soluţie hipertonă de NaCl (vezi p.315).

Flora exsudatului bronşic este reflectată cel mai fidel de aspiratul traheal prin puncţie sublaringiană. Probele supuse hazardului contaminării cu microbiota căilor aeriene superioare - sputa, aspiratul traheo-bronşic pe cale nazală sau bucală ş.a. - reflectă mai puţin fidel flora exsudatului bronşic. Sputa o reflectă cu atît mai puţin fidel cu cît tusea este mai slab productivă. Cel mai puţin fidel este reflectată de tamponul nazo-faringian recoltat la copii în lipsa sputei.

Probele de spută trebuie transportate, imediat după recoltare, la laborator unde sînt examinate fără întîrziere.

Menţinerea la temperatura camerei determină

*) Produsul de spălătură gastrică trebuie neutralizat imediat cu sol.10% carbonat de sodiu în prezenţa unui indicator de pH.

modificări ale raporturilor cantitative dintre bacteriile probei prin multiplicarea saprofiţilor de contaminare.

Refrigerarea, dacă depăşeşte 1-3 ore, devine nocivă pentru unele dintre bacteriile infectante (H.influenzae ş.a.)

Examenul bacteriologic de rutină al sputei

Decontaminarea = îndepărtarea excesului de salivă din probă. Se face prin spălare în ser fiziologic a unui fragment purulent din spută.

In cutii Petri, se pregătesc 3 băi cu minimum 1o-15 ml ser fiziologic steril fiecare.

Se prelevă din probă un fragment purulent, mucopurulent sau sanguinolent (în funcţie de aspectul sputei) şi se spală succesiv în cele 3 băi, cîte un minut în fiecare baie. Manipularea se face cu o pipetă Pasteur boantă şi cu ansa cu fir gros.

Omogenizarea = asigură repartiţia uniformă a microbului infectant în eşantionul examinat microscopic şi în cel cultivat.

Din ultima baie de spălare, fragmentul purulent este trecut într-o cutie Petri separată unde, într-o mică cantitate de ser fiziologic, cu o seringă proba este omogenizată prin aspirări şi respingeri repetate.

Examenul direct microscopic

Din proba decontaminată şi omogenizată se efectuează 3 frotiuri care se colorează:

- cu albastru de metilen sau, mai bine, May-Grünwald-Giemsa pentru urmărirea reacţiei celulare;

- Gram pentru urmărirea bacteriilor;
- Ziehl-Neelsen pentru urmărirea bacililor acido-rezistenţi.

Prezenţa pe frotiul din spută a polinuclearelor şi macrofagelor certifică existenţa exsudatului bronho-pulmonar în proba examinată.

Prezenţa pe frotiu a celulelor epiteliale scuamoase indică contaminarea probei de spută cu secreţii bucale.

Chiar în prezenţa polinuclearelor şi macrofagelor, cu cît numărul celulelor epiteliale scuamoase este mai mare cu atît proba de spută este mai puţin reprezentativă.

Prezenţa pe frotiul din spută a unui mare număr de eozinofile indică existenţa unui proces alergic bronho-pulmonar.

Exceptînd prezenţa pe frotiul din spută -
- numeroşi coci ovalari, gram-pozitivi, capsulaţi, aşezaţi în perechi sau scurte lanţuri (sugestivi pentru o pneumonie pneumococică),
- numeroşi bacili scurţi, groşi, gram-negativi, capsulaţi (sugestivi pentru o pneumonie cu Klebsiella)

prezenţa altor bacterii, chiar în număr mare, este greu de interpretat.
Si într-o spută contaminată cu salivă frotiul evidenţiază numeroase bacterii, dar acestea, variate ca formă şi afinitate tinctorială, sînt masate evident pe fondul celuleor scuamoase de contaminare bu-

cală (în special coci ovalari, gram-pozitivi necapsulaţi, aşezaţi în perechi şi lanţuri).

Probele pentru care examenul direct microscopic semnalează o contaminare masivă cu secreţii bucale sau exclusiv secreţii bucale nu se examinează în continuare.

Sputocultura

Prima zi. Din proba decontaminată şi omogenizată, se epuizează o ansă pe o placă cu geloză-sînge. Epuizarea se face în 4 arii succesive (fig.56). Pe aceeaşi placă, peste ariile de epuizare a probei se însămînţează 4 striuri de stafilococ auriu pentru a facilita izolarea şi identificarea H.influenzae. De asemenea, se depun 2 rondele de hîrtie de filtru impregnate cu optochin pentru diferenţierea prezumtivă a pneumococului infectant de streptococi α-hemolitici de contaminare (fig.56).

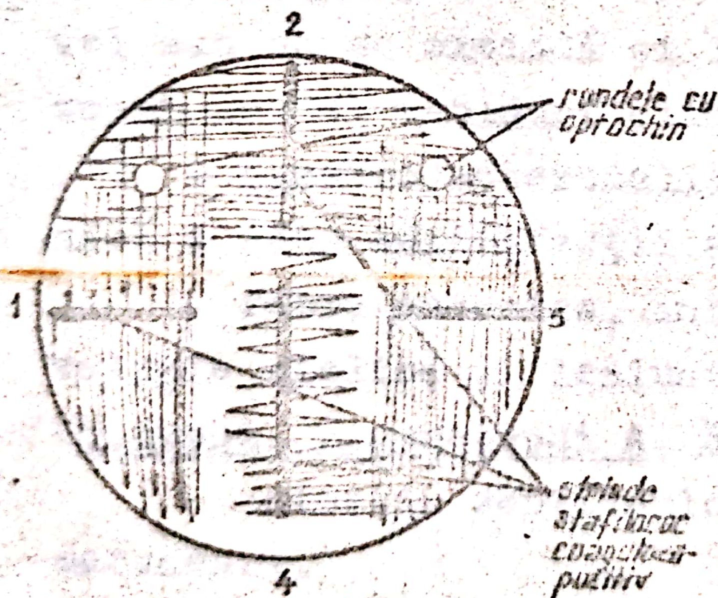


Fig.56 Sputocultura: modul în care se epuizează inoculum

Se incubează, în borcan cu lumînare, peste noapte la 37°C.

Probele de spută de la bolnavi cu supuraţii pulmonare sînt cultivate şi în anaerobioză.

A doua zi. Se procedează la identificarea coloniilor care sînt sugestive pentru principalele bacterii ce pot da infecţii bronho-pulmonare

şi predomină cantitativ în cultură (prezente în ultimile arii de epuizare a probei).

Dacă izolatul predominant şi în cantitate mare este pneumococul, <u>Klebsiella friedländeri</u>, <u>H.influenzae</u>, stafilococul auriu sau alt oportunist capabil a da infecţii bronho-pulmonare poate fi implicat în etiologia infecţiei investigate. I. se face antibiograma.

Prezenţa în cantitate mică şi în cultură mixtă a pneumococului, <u>Kl.friedländeri</u>, <u>H.influenzae</u>, a stafilococului auriu sau a altor oportunişti capabili a da infecţii bronho-pulmonare face dubioasă implicarea lor etiologică. In asemenea situaţii, dacă proba a fost într-adevăr recoltată înaintea administrării tratamentului antimicrobian, pot fi în cauză etiologia virală, <u>Mycoplasma pneumoniae</u> ş.a.

Izolarea din probă, indiferent de cantitate, a unei bacterii patogene cunoscută a da infecţii bronho-pulmonare (<u>Mycobacterium tuberculosis</u> ş.a.) obligă la implicarea etiologică.

<u>Inocularea la şoarece</u>

Dacă frotiul gram este sugestiv pentru prezenţa pneumococului sau <u>Kl.friedländeri</u>, proba poate fi inoculată sub-cutan la şoarece în vederea izolării acestor bacterii (vezi capitolele 11 şi 13, p.148 şi p.167).

32 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR INTESTINALE SI TOXIINFECTIILOR ALIMENTARE. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL MATERIILOR FECALE.

In etiologia infecţiilor intestinale bacteriile au cea mai însemnată pondere; virusurile şi protozoarele sînt mai rar implicate.

(i) Infecţiile intestinale cu bacterii patogene cu rol etiologic bine precizat - Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae - sînt în general uşor de recunoscut. Evidenţierea acestor bacterii într-o probă de scaun diareic obligă la implicarea lor etiologică.

Infecţiile iniţiate de Salmonella la nivelul intestinului pot să evolueze localizate la acest nivel sau să se extindă şi la alte organe. Se realizează astfel tablouri clinice variate:

- (gastro)enterocolite, frecvent expresia clinică a unor toxiinfecţii alimentare,
- febre enterice, infecţii generalizate cu evoluţie ciclică şi leziuni intestinale tipice (S.typhi, S.paratyphi A, B sau C),
- infecţii septicemice cu sau fără localizări secundare.

Variatele tipuri de Shigella determină dizenteria bacilară.

V.cholerae determină holera, o enterită acută cu evoluţie foarte gravă.

(ii) Infecţiile intestinale cu bacterii condiţionat patogene, oportuniste, sînt mai dificil de diagnosticat. Implicarea lor etiologică trebuie judecată în funcţie de circumstanţele apariţiei îmbolnăvirii.

In diareea epidemică a nou născutului rolul etiologic al tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli este bine precizat. Dintre acestea, Esch.coli $O_{124}B_{17}$ poate determina şi enterocolite ale adultului.

Staphylococcus aureus şi Candida albicans pot să realizeze enterocolite pseudomembranoase postantibiotice.

Un număr relativ redus de enterocolite sînt determinate de Yersinia enterocolitica.

La pacienţi cu apărarea antiinfecţioasă deficitară (nou născuţi, prematuri, bolnavi cu neoplazii ş.a.) diarei acute pot fi asociate cu Klebsiella, Proteus, Pseudomonas aeruginosa ş.a.

Toxiinfecţii alimentare pot apare ca urmare a consumului de alimente în care s-au multiplicat excesiv salmonelle ş.a. sau în care s-au multiplicat şi au elaborat entero(neurotoxine) stafilococi, Clostridium botulinum.

Pentru diagnosticul etiologic al enterocolitelor se examinează probe de materii fecale

> Pentru diagnosticul etiologic al febrelor enterice se examinează în afară de materiile fecale şi produse alese în funcţie de stadiul evolutiv al bolii: sînge, măduva osoasă, urina, bila.

> Pentru diagnosticul toxiinfecţiilor alimentare se examinează probe de alimente, vărsături, materii fecale.

Materiile fecale şi condiţia lor bacteriologică

Normal, materiile fecale conţin un număr considerabil de bacterii aparţinînd unor diverse specii saprofite sau comensale, aerobe şi anaerobe: nepatogene (specii de *Lactobacillus*) sau oportuniste cu potenţial variabil de patogenitate (bacili coliformi, specii de *Proteus*, stafilococi, inclusiv stafilococi coagulazo-pozitivi, enterococi, peptostreptococi, specii de *Bacteroides*, *Clostridium* ş.a)

Raporturile cantitative între aceste numeroase specii sînt influenţate de dietă ca şi de desfăşurarea normală sau anormală a proceselor de digestie.

Recoltarea şi transportul probelor

> Probele de materii fecale pentru diagnosticul infecţiilor intestinale sau al purtătorilor de enterobacterii patogene se recoltează înaintea administrării oricărui tratament antimicrobian.

Probele se recoltează din scaun ca atare sau

direct din rect cu sonda Nelaton ori cu tamponul.

(i) Recoltarea probelor din scaun. Bolnavul defecă într-un vas (bazinet, oală de noapte) curat, fără urme de antiseptic, sterilizat prin fierbere. La nou născut şi sugar probele se recoltează din scaunul de pe pelinca în prealabil sterilizată.

Se urmăresc şi se prelevă, dacă există, fragmente muco-sanguinolente, muco-purulente, granulaţii riziforme etc. Recoltarea se face cu ajutorul unei mici spatule de lemn sterile. Proba, în cantitate de cca 1 g, se suspensionează în 3-4 ml ser fiziologic sau mediu de transport într-un flacon steril, cu gura largă, prevăzut cu dop de bumbac sau mai bine cu capac cu ghivent (fig.57).

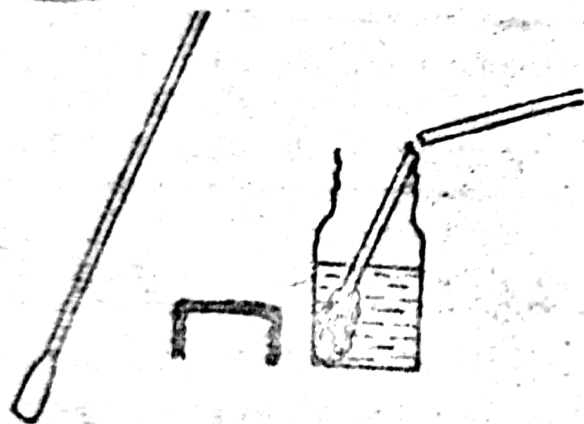


Fig.57 Model de spatulă şi recoltor pentru materii fecale

(ii) Recoltarea direct din rect se face cu tamponul sau cu sonda Nelaton.

Sonda Nelaton se introduce în rect pe o distanţă de cca 15 cm la adult şi corespunzător mai puţin la copil. După recoltarea probei, sonda se descarcă prin agitare într-un flaconaş cu ser fiziologic sau mediu de transport.

In cazurile de dizenterie cronică se recomandă recoltarea cu tamponul, în cursul proctoscopiei,

direct din rect cu sonda Nelaton ori cu tamponul.

(i) Recoltarea probelor din scaun. Bolnavul defecă într-un vas (bazinet, oală de noapte) curat, fără urme de antiseptic, sterilizat prin fierbere. La nou născut şi sugar probele se recoltează din scaunul de pe pelinca în prealabil sterilizată.

Se urmăresc şi se prelevă, dacă există, fragmente muco-sanguinolente, muco-purulente, granulaţii riziforme etc. Recoltarea se face cu ajutorul unei mici spatule de lemn sterile. Proba, în cantitate de cca 1 g, se suspensionează în 3-4 ml ser fiziologic sau mediu de transport într-un flacon steril, cu gura largă, prevăzut cu dop de bumbac sau mai bine cu capac cu ghivent (fig.57).

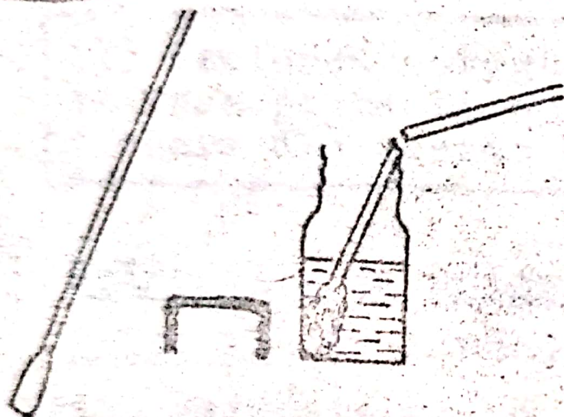


Fig.57 Model de spatulă şi recoltor pentru materii fecale

(ii) Recoltarea direct din rect se face cu tamponul sau cu sonda Nelaton.

Sonda Nelaton se introduce în rect pe o distanţă de cca 15 cm la adult şi corespunzător mai puţin la copil. După recoltarea probei, sonda se descarcă prin agitare într-un flaconaş cu ser fiziologic sau mediu de transport.

In cazurile de dizenterie cronică se recomandă recoltarea cu tamponul, în cursul proctoscopiei,

direct de la nivelul ulcerațiilor mucoasei.

In izbucnirile epidemice de enterocolită recoltarea probelor din scaun este dificil de realizat. In aceste circunstanțe recoltarea pe tampon sau sondă Nelaton direct din rect dă rezultate tot atît de bune.

Pentru examinări la convalescenți sau pentru depistarea purtătorilor de enterobacterii patogene este mai indicată recoltarea probelor din scaun decît recoltarea pe tampon*). Recoltarea se face, după purgare (numai pentru depistarea purtătorilor), din ultimile fracțiuni ale scaunului.

Sansele de izolare a unor patogeni cum sînt Salmonella și Shigella sau a tulpinilor enteropatogene de Esch.coli cresc dacă se examinează probe multiple recoltate de la același pacient în cursul stadiului acut al bolii diareice (primele 3 zile) cînd aceste organisme se află prezente în număr mare în intestin.

Probele trebuie examinate cît mai curînd posibil după recoltare. Shigellele sînt deosebit de sensibile la antagonismul exercitat de flora de contaminare a fecalelor. Rata de supraviețuire a salmonellelor este mai mare, mai ales dacă se re-

---

*) La convalescent sau purtătorul sănătos bacteriile patogene se află în număr redus în materiile fecale. Dacă pe tampon se recoltează o probă de aproximativ loo mcg și în materiile fecale patogenul este în cantitate mai mică de lo.ooo/g, se înțelege că șansa de izolare din asemenea probă este redusă.

curge la medii de transport şi refrigerare.

Examenul bacteriologic al materiilor fecale

Examenul direct microscopic al materiilor fecale este inutil. Este indicat numai în cazul particular al probelor de la pacienţi cu enterocolită postantibiotice (vezi p. 33o).

> (i) Izolarea patogenilor din materii fecale se face pe medii selective adecvate pentru fiecare din aceste bacterii.

Salmonella şi Shigella

Prima zi. Se însămînţează în paralel o placă cu mediu selectiv şi un tub cu mediu de îmbogăţire. Se incubează peste noapte la 37°C.

Mediile slab selective şi diferenţiale: Mac Conkey, Leiffson ş.a. inhiba majoritatea bacteriilor gram-pozitiv şi permit izolarea bacililor gram-negativi intestinali pe care îi diferenţiază în lactozo-pozitivi şi lactozo-negativi. Sînt convenabile pentru izolarea shigellelor, organisme cu vitalitate mai redusă, care pe medii mai selective pot fi inhibate.

Medii moderat selective şi diferenţiale: mediul SS (Salmonella-Shigella), mediul cu dezoxicholat-citrat ş.a. Sînt convenabile pentru izolarea salmonellelor. Prin conţinutul lor în săruri biliare, verde brillant şi citrat sînt mai puţin convenabile pentru unele specii de Shigella mai sensibile.

Mediile puternic selective, cum este mediul Wilson-Blaire cu sulfat de bismut, sînt indicate pentru izolarea salmonellelor, în special S. typhi.

Mediile de îmbogățire, cum sînt bulionul cu selenit sau bulionul cu tetrationat, inhiba dezvoltarea bacteriilor gram-pozitive și limitează pentru o perioadă scurtă (12-18 ore) multiplicarea coliformilor și a speciilor de Proteus favorizînd în același timp multiplicarea salmonelelor și shigellelor.

A doua zi. Se cercetează prezența coloniilor lactozo-negative.

- Coloniile lactozo-negative sînt absente. Se face o repicare din mediu de îmbogățire* pe mediu selectiv și se incubează peste noapte la 37°C.

- Coloniile lactozo-negative sînt prezente. Se repică*), pentru triajul biochimic (mediu Hajna, mediu pentru uree și mobilitate) și pentru verificarea purității culturii (mediu Drigalski), cîte o colonie lactozo-negativă din fiecare tip prezent (vezi capitolul 13, pp.162-164).

A treia zi. Se recurge la identificarea antigenică și biochimică completă a tulpinilor pentru care testele de triaj sugerează o Salmonella sau o Shigella (vezi capitolul 13, pp.169-173).

---

*) In vederea repicării:

- Nu se va răci ansa atingînd cu ea suprafața mediului selectiv. Pe suprafața mediului pot fi prezente bacterii inhibate, care își pot relua dezvoltarea pe mediile de triaj biochimic sau diferențiale.

- Prelevarea cu ansa se face atingînd ușor numai suprafața coloniei în centrul ei. In profunzime pot exista bacterii de conțaminare inhibate.

(ii) Izolarea condiţionat patogenilor din scaunul diareic se face pe medii diferenţiale neselective, care permit evidenţierea fidelă a organismelor predominante.

Izolarea tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli (urmărite sistematic în enterocolitele copilului sub 2 ani).

Prima zi. Proba se epuizează pe un mediu diferenţial lactozat*) (mediul Mac Conkey, EMB sau Drigalski). Se incubează peste noapte la 37°C.

A doua zi. Prin reacţii de aglutinare pe lamă cu ser polivalent se repereazză coloniile de Esch.coli posibil enteropatogene.

A treia zi. Se continuă identificarea prin reacţii de aglutinare cu seruri monovalente (vezi capitolul 13, pp.164-165; capitolul 6, pp.91-96).

Pentru detectarea tulpinilor enteropatogene de Esch.coli, colorarea cu anticorpi fluorescenţi a frotiului din materii fecale este o metodă mai rapidă şi mai sensibilă decît izolarea.

Trebuie reţinut faptul că enteritele nou născutului şi sugarului pot fi determinate şi de alte bacterii patogene sau condiţionat patogene. De aceea,

*) Unele tulpini enteropatogene de Esch.coli nu pot fi izolate pe mediul MacConkey dar cresc foarte bine pe geloză-sînge. De aceea, epuizarea probei şi pe o placă cu geloză sînge este o precauţie necesară.

probele de materii fecale diareice de la copilul sub 2 ani, ca şi cele de la copilul mare sau adult, se vor epuiza în paralel şi pe medii selective.

Examenul materiilor fecale la pacienţii cu enterocolită postantibiotice

Examenul direct microscopic poate aduce date utile.

Dacă este în cauză stafilococul, frotiul va evidenţia predominanţa netă a cocilor gram-pozitivi în grămezi, ceea ce nu se întîmplă în alte situaţii

Dacă este în cauză *Candida albicans*, frotiul va evidenţia numeroase elemente miceliene şi levuriforme (*Candida* saprofită prezintă numai elemente levuriforme).

Semnificaţia izolării stafilococilor coagulazo-pozitivi din probe de materii fecale

De la lo-2o% din indivizii normali se izolează din materiile fecale stafilococi coagulazo-pozitivi Această proporţie creşte considerabil la pacienţii spitalizaţi şi în special după administrarea de antibiotice. Asemenea pacienţi purtători intestinali de stafilococi coagulazo-pozitivi pot să facă enterocolite cu totul alte etiologii decît cea stafilococică.

Simpla prezenţă într-o probă de scaun diareic a stafilococilor coagulazo-pozitivi nu semnifică obligator implicarea lor etiologică.

Pentru a fi implicați în etiologia unei enterocolite postantibiotice, stafilococii coagulazo-pozitivi trebuie să fie floră predominantă în proba de scaun diareic.

Această predominanță poate fi demonstrată numai prin examen direct microscopic coroborat cu rezultatele izolării pe geloză sînge.), mediu neselectiv..) care nu perturbă raporturile cantitative dintre bacteriile probei.

La un bolnav cu enterocolită postantibiotice predominanța în frotiul din scaunul diareic a cocilor gram-pozitivi în grămezi și predominanța pe placa cu geloză-sînge, pe care s-a epuizat proba, a coloniilor de stafilococ coagulazo-pozitiv pune diagnosticul de enterocolită stafilococică postantibiotice.

Dacă investigația bacteriologică a unei probe de scaun diareic nu a putut dovedi ca agent etiologic o bacterie patogenă (Shigella, Salmonella ș.a.), Escherichia coli enteropatogenă, trebuie

---

.) Pentru a preveni invadarea plăcilor cu Proteus, în aceste situații, se adaugă la mediu phenylethanol sau se recurge la o geloză cu concentrație mai mare de agar (4% în loc de 2%).

..) Izolarea stafilococilor coagulazo-pozitivi pe medii selective hiperclorurate (mediu Chapman ș.a.) nu poate demonstra prezența lor predominantă într-o probă de scaun. De aceea nu opiniem pentru utilizarea unor asemenea medii care, în mîna celor neavizați, pot duce la rezultate eronate.

investigată intervenţia posibilă a unui saprofit oportunist (Klebsiella, Proteus, Ps.pyocyanea). Implicarea acestora poate fi făcută pe baza criteriului cantitativ: predominanţa lor în cultura pe medii neselective. Dar la pacienţii care au primit antibiotice nici acest criteriu nu este suficient din cauza dezechilibrului creat de antibiotic în microbiota intestinului, dezechilibru care nu duce obligator la enterocolită.

Pentru confirmarea sau infirmarea rolului etiologic al bacteriei anormal predominantă cantitativ, se poate recurge la autoserodiagnostic. Autoserodiagnosticul are însă dezavantajul confirmării tardive a diagnosticului.

Privitor la evidenţierea şi identificarea bacteriilor sau/şi toxinelor lor în probe de alimente, vărsături şi materii fecale din izbucniri epidemice de toxiinfecţii alimentare se vor consulta capitolele 10, 13, 18.

In concluzie

Pentru diagnosticul bacteriologic al unei enterocolite probele de scaun diareic vor fi epuizate în paralel pe
- medii selective adecvate pentru izolarea patogenilor (Salmonella, Shigella ş.a.)
- medii diferenţiale, neselective, pentru izolarea tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli şi pentru a urmări rapoturile cantitative dintre saprofiţii condiţionat patogeni.

33 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR CAILOR GENITALE LA FEMEIE

Mucoasa căilor genitale la femeie cuprinde 2 zone distincte:

- o zonă contaminată: vulvă, vagin, exocol;
- o zonă normal sterilă: uter, trompe, endocolul fiind zonă de tranziţie.

Flora normală a zonei contaminate este reprezentată de:

Lactobacili,
Bacili coliformi,
Specii de Bacteroides şi alţi bacili anaerobi nesporulaţi,
Coci gram-pozitivi şi gram-negativi: stafilococi, enterococi şi alţi streptococi aerobi şi anaerobi,
Neisseria „nepretenţioase" şi Veillonella,
Haemophilus vaginalis,
Specii de Candida,
Micobacterii saprofite,
Specii de Mycoplasma.

Lactobacillus acidophilus (bacilul Döderlein) este bacteria normal predominantă a florei vaginale de la pubertate pînă la menopauză; prin pH-ul acid pe care îl creează antagonizează restul florei bacteriene. Prezenţa sa este influenţată de hormonii genitali care controlează depunerile de glicogen la nivelul celulelor epiteliului vaginal, existînd o variaţie numerică în funcţie de vîrstă, în sarcină şi chiar în cursul ciclului menstrual (absent imediat după menstruaţie, creşte progresiv spre sfîrşitul ciclului).

<u>Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor căilor genitale inferioare</u> (regiune normal contaminată).

Infecţiile la acest nivel evoluează cel mai frecvent ca vulvo-vaginite.

<u>Recoltarea produsului patologic</u> se efectuează pe masa ginecologică după toaletă externă urmată, la pacientele cu exsudat vaginal abundent, de spălătură vaginală. Subliniem că atît spălătura externă cît şi cea vaginală, mai ales, trebuie făcute cu irigator steril şi apă sterilă iar excesul de apă îndepărtat prin tamponare cu comprese sterile. Produsul se va recolta cu ajutorul tamponului folosind valve sterile, fără urme de antiseptice sau lubrefiant.

- Dacă există ulceraţii, eroziuni, zone hemoragice, recoltarea se face din zonele de afectare maximă;

- în absenţa acestora, din zona cea mai înaltă a mucoasei vaginale - fundul de sac posterior sau din orificiul extern al colului (mai ales în suspiciunea de infecţie gonococică).

Pentru recoltare se folosesc 3 tampoane:

- unul dintre ele va fi imediat descărcat într-un volum mic de ser fiziologic steril şi va servi pentru diagnosticul microscopic al trichomonazei vaginale (vezi cursul de parazitologie);

- din al doilea tampon se vor efectua 3 frotiuri care vor fi colorate Gram (pentru urmărirea

bacteriilor) şi cu albastru de metilen (pentru urmărirea reacţiei celulare), al treilea frotiu rămîne în rezervă, necolorat;

- al treilea tampon, în suspiciunea de infecţie gonococică, va servi pentru însămînţare.

Examenul microscopic. In infecţia mucoasei vaginale, pe frotiul colorat cu albastru de metilen (preferabil Giemsa) se evidenţiază polinucleare abundente şi celule epiteliate profunde de descuamaţie. Frotiul colorat Gram poate stabili în unele cazuri diagnosticul etiologic. Astfel:

- prezenţa de diplococi gram-negativi care „burează" polinuclearele este aspectul patognomonic pentru infecţia gonococică acută;

- pentru candidoza vaginală pledează prezenţa de celule levuriforme, sferice sau ovoide, şi în special a formelor pseudomiceliene gram-pozitiv dominante numeric în raport cu restul florei;

- în infecţia cu H.vaginalis este deosebit de tipic numărul mare de bacili scurţi gram-negativi formînd cîmpuri aproape compacte; în frotiu predomină celulele epiteliale de descuamaţie şi nu polinuclearele.

Cultura

Intrucît la femeie în infecţia gonococică examenul microscopic este foarte rar pozitiv, diagnosticul se pune cu mult mai multe şanse prin însămînţarea probei de exsudat vaginal pe mediul Mueller-Hinton selectiv (prin adaus de lincomicină, colimi-

cină și nistatin, antibiotice fără acțiune asupra gonococului, dar acive față de flora de asociație). Plăcile însămînțate se incubează 24-48 ore la 37°C în atmosferă cu 5-10% bioxid de carbon, saturată în vapori de apă (pentru identificarea gonococului vezi capitolul 12, p.157).

Vaginitele cu Trichomonas vaginalis, H.vaginalis și cele micotice pot fi diagnosticate prin examen microscopic. Pentru infecția gonococică, rar diagnosticată microscopic, este necesară izolarea și identificarea gonococului.

Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor căilor genitale superioare (zonă normal sterilă).

Infecțiile căilor genitale superioare survin în urma însămînțării, cel mai frecvent ascendente, a mucoasei uterine cu bacterii patogene sau condiționat patogene aerobe sau anaerobe; de la nivelul endometrului infecția se poate extinde la trompă, ovar, în formele grave putînd determina pelviperitonite, peritonite generalizate și septicemii. Cele mai severe sînt infecțiile post-abortum și post-partum. Bacteriile cel mai frecvent implicate în aceste infecții sînt: *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, enterococii, stafilococul auriu, streptococii anaerobi, specii de *Bacteroides*.

Produsele patologice supuse examenului bacte-

riologic sînt reprezentate de:

- secreţii uterine sau produse de chiuretaj,
- puroi extras prin puncţionarea fundului de sac Douglas,
- fragmente de ţesut sau puroi recoltate intraoperator,
- sînge.

Pentru a evita contaminarea primelor 2 categorii de produse cu floră vaginală în cursul recoltării, recolta se va face după toaleta atentă a vaginului cu apă sterilă şi irigator steril.

Hemocultura şi examenul bacteriologic al puroiului recoltat intraoperator sau prin puncţie se bazează pe metodologia consemnată în capitolele 26, 27.

Produsul de chiuretaj va fi mojarat steril cu o mică cantitate de ser fiziologic şi va servi:

- pentru efectuarea unui frotiu colorat Gram,
- pentru însămînţarea pe medii de cultură;
- eventual pentru inoculare la animal.

Examenul microscopic al frotiului din produsul de chiuretaj poate pune în evidenţă una, două sau chiar trei morfologii, infecţia fiind mixtă mai ales în avortul septic.

Cînd în frotiu este prezentă o floră deosebit de variată, de cele mai multe ori este vorba de o contaminare la recoltare cu floră vaginală sau produsul a fost supus cu întîrziere examenului bacteriologic. Intrucît în acest caz rezultatele sînt

greu interpretabile sau chiar eronate, proba nu se prelucrează în continuare.

Cultura va fi efectueată pe 2 plăci cu geloză sînge incubate aerob şi anaerob, epuizarea făcîndu-se prin metoda care permite o apreciere semicantitativă a florei prezente (aceeaşi schemă de epuizare ca şi pentru spută, vezi fig.56). Fiind un produs dintr-o zonă normal sterilă, se recurge, cînd densitatea bacteriilor o permite, şi la efectuarea antibiogramei pe cultură primară în condiţii aerobe şi anaerobe.

In cazul în care în frotiu sînt prezenţi bacili gram-pozitivi sugerînd clostridii, produsul va fi inoculat intra-muscular la 1-2 cobai.

> Bacteriile izolate din produsele recoltate intraoperator sau în hemocultură vor fi considerate drept agenţi etiologici ai infecţiei prezente.
>
> Pentru produsele din cavitatea uterină, care traversează o zonă normal contaminată în momentul recoltării, se vor lua în consideraţie numai izolaţii dominanţi aerobi sau anaerobi.

La indicaţia expresă a clinicianului, examenul bacteriologic al produselor provenite din sfera genitală la femeie va fi condus pentru stabilirea diagnosticului de infecţie cu Listeria monocytogenes (vezi capitolul 16, p.196), Mycoplasma hominis (vezi capitolul 23, p.226), sau Mycobacterium tu-

berculosis*) (vezi capitolul 21, p.213).

./.

---

*) M.tuberculosis va fi cercetat în produsul de raclaj uterin, sînge menstrual sau diferite exsudate recoltate prin puncție; sîngele menstrual va fi imediat supus hemolizei cu apă distilată și trimis la laborator.

A N E X A   A

PREPARAREA COLORANTILOR ŞI REACTIVILOR NECESARI COLORARII BACTERIILOR

Prepararea soluţiilor alcoolice saturate ale colorantilor bazici

Colorant (de exemplu, albastru de metilen, violet de genţiană sau fucsină bazică)	10 g
Alcool etilic 96°	100 g

Se mojarează colorantul, se adaugă o parte din alcool şi se continuă mojararea. Se transvazează într-o sticlă cu dop rodat. Restul alcoolului se adaugă treptat, în porţiuni mici, pentru a spăla colorantul din mojar, fiecare porţiune transvazîndu-se apoi în sticlă. Se menţine sticla la 37°C timp de 7 zile cu agitare ocazională. Se filtrează prin hîrtie. Filtratul reprezintă soluţia alcoolică saturată a colorantului.

Prepararea soluţiilor de lucru

Prepararea soluţiei de albastru de metilen Loeffler

Sol.alcoolică saturată de albastru de metilen	30 ml
Soluţie 1% KOH	1 ml
Apă distilată	100 ml

Se foloseşte pentru coloraţii simple sau pentru recolorare în coloraţia Ziehl-Neelsen.

Prepararea soluţiei de violet de metil

Violet de metil	0,2 g
Apă distilată	100 ml

Se filtrează prin hîrtie.

Se foloseşte în coloraţia Gram. Pentru coloraţia Gram se mai pot folosi, cu rezultate mai puţin bune, şi violet de genţiana

sau cristal violet.

Prepararea soluției de fucsină fenicată Ziehl

Sol.alcoolică saturată de fucsină bazică	10 ml
Sol.5% fenol în apă distilată	100 ml

Se filtrează prin hîrtie.

Se folosește în colorația Ziehl-Neelsen. Această soluție diluată 1/10 cu apă distilată se folosește pentru colorații simple sau pentru recolorare în colorația Gram.

Prepararea soluției Lugol

Iod sublimat	1 g
Iodură de potasiu	2 g
Apă distilată	200 ml

Se solvă iodura de potasiu în cca 20 ml apă, se adaugă și se solvă iodul, apoi se adaugă restul de apă.
Se folosește ca mordant în colorația Gram.

Prepararea amestecului decolorant alcool-acetonă

Alcool etilic 96°	3 vol.
Acetonă	1 vol.

./.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

PARTEA INTIIA

Capitolul 1

CRUICKSHANK R. (1965): Medical Microbiology a Guide to The Laboratory Diagnosis and Control of Infection, ed.XI-a, E.& S. Livingstone Limited, Edinburgh and London, capitolul 46.

SCHMIDT J., NAUMANN G., HORSCH W. (1968): Sterilisation, Desinfektion und Entwesung in der medizinischen und pharmazeutischen Praxis einschliesslich Herstellung von Injektionsarznein, VEB Georg Thieme, Leipzig.

SPRÖSSIG M., ANGER G. (1972): Mikrobiologisches [illegible], ed.II-a, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 62-75.

SYMPOSIUM (1967): Radiosterilization of Medical Products. Proceeding of a Symposium, Budapest, 5-9 June 1967, I.A.E.A., Vienna.

PARTEA A DOUA

Capitolul 2

RICHARDS O.W. (1971): Microscopy, în Manual of Clinical Microbiology ed.de Blair J.E., Lennette E.H., Truant J.P., Am.Soc.Microbiol., Bethesda.

BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, Saint Louis, pp. 9-15.

Capitolele 3 şi 4

BITTNER J. (1975): Metodă simplă pentru realizarea condiţiilor de anaerobioză generală. Microbiologia (Bucureşti), 20, pp. 55-62.

COWAN S.T., STEEL K.J. (1966): Identification of Medical Bacteria, Cambridge University Press.

PINCH TH. (1971): Identification des Bactéries, în Cours de Microbiologie Systématique de l'Institut Pasteur (Paris), lecţia 18.

MESROBEANU L., PAUNESCU E. (1960): Fiziologie bacteriană, Ed.Academiei R.P.R., Bucureşti.

Capitolul 5

DUMAS J. (1953): Les animaux de laboratoire. Anatomie, particularités physiologiques, hématologie, maladies naturelles, experimentation, Ed. Flammarion, Paris.

HOFFMAN G. (1961): Abriss der Laboratoriumstierkunde, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

MORIS F. (1971): Experimentation sur les animaux de laboratoire în Cours de Microbiologie Systématique de l'Institut Pasteur (Paris), lecţia 16.

PARTEA A TREIA

Capitolele 6 şi 7

DUCA E. (1974): Microbiologie Medicală, Ed.Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, capitolele XVII, XX-XXII.

DUCA E., BERNESCU E. (1976): Propuneri privind standardizarea serodiagnosticului sifilisului. Rev.Med.Chir.(Iaşi), nr. 3, pp. 457-467.
Ibid. nr. 4, pp. 611-619.

DUCA M., DUCA E., BERNESCU E., MOROSANU V. (1976): Criterii pentru utilizarea unei tehnici unice de fixare a complementului în serodiagnosticul bolilor infecţioase, Rev.Med.Chir. (Iaşi), nr. 2, pp. 283-292.

FAURE M., PAUTRIZEL R., LE MINOR L. (1965): Cum interpretăm reacţiile serologice practicate în bolile infecţioase şi parazitare, Ed. Medicală, Bucureşti.

STAUB A.M., RAYNAUD M. (1971): Cours d'Immunologie Générale et de Sérologie de l'Institut Pasteur (Paris), Ed. C.D.U., Paris, fascicula III.

PARTEA A PATRA

Capitolele 8 şi 9

BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, Saint Louis, pp. 313-332.

BALS M. (1976): Testarea sensibilităţii germenilor la antibiotice. Viaţa Medicală, 23, pp. 2o7-2o9.

BALS M. (1976): Terapia Infecţiei, ed.II-a, Ed.Medicală, Bucureşti, pp. 294-342.

DUCA E., BERNESCU E. (197o): Circulaţia factorilor de rezistenţă la antibiotice. Implicaţii practice privind antibiograma şi antibioterapia. Rev.Med.Chir.(Iaşi), nr.3, pp. 792-797.

GARROD L.P., WATERWORTH P.M. (1971): A study of antibiotic sensitivity testing with proposals for simple uniform methods. J.clin.Path., 24, pp. 779-789.

O.M.S. (1961): Sér.rapp.techn. No.21o. Standardisation de la méthodologie des tests de sensibilité bactérienne. Deuxième rapport du Comité d'experts des antibiotiques, Génève.

STOKES E.J. (1968): Clinical Bacteriology, ed.III-a, E.Arnold, London, capitolul 7.

WELSCH M. (1965): Cum interpretăm analizele bacteriologice şi probele de sensibilitate la antibiotice, Ed. Medicală, Bucureşti, capitolul IV.

PARTEA A CINCEA

Manuale şi tratate consultate pentru capitolele 1o-23

BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, Saint Louis, capitolele 16-3o.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, ed.VIII-a, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1975.

BLAIR J.E., LENNETTE E.H., TRUANT J.P. (1971): Manual of Clinical Microbiology, Am.Soc.Microbiol., Bethesda, capitolele 5-36.

BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A. (1969): Manuel de Techniques Bactériologiques, ed.III-a, Ed. Flammarion, Paris, partea 3-a, capitolele 1-17.

DUCA E. (1974): Microbiologie Medicală, Ed.Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, capitolele 23-36.

INSTITUT PASTEUR (PARIS) (1971): Cours de Microbiologie Systématique de l'Institut Pasteur (Paris), lecţiile 22-93.

IOAN C.L., MUNTEANU-IVANUS N., IOAN C. (1973): Diagnosticul de laborator al bacteriilor patogene, Ed.Medicală, Bucureşti.

NESTORESCU Nç (1965): Bacteriologie Medicală, Ed. Medicală, Bucureşti, partea a 3-a.

SPRÖSSIG M., ANGER G. (1972): Mikrobiologisches Vademekum, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, capitolele 2.1.2-2.1.9. şi 2.2.

STOKES E.J. (1968): Clinical Bacteriology, ed.III-a, E.Arnold, London, capitolul 5.

Capitolul 1o

BLAIR J.E. (1962): What is a Staphylococcus. Bact.Rev., 26, (375-381).

MARSIK F.J., PARISI J.T. (1973): Significance of S.epidermidis in the clinical laboratory. Appl.Microbiol., 25, pp. 11-14.

POPOVICI M., GRECEANU V., ALEXENCO E., VIANU I., IONESCU-CALIN C. (1973): Staphylocoques blancs, coagulase-négatifs, isolés dans des processus infectieux chez l'homme. Arch.Roum.Path.Exp.Microbiol., 31, pp.61-67.

Capitolul 11

DEIBEL R.H. (1964): The Group D Streptococci. Bact.Rev., 28, pp.33o-366.

LORIAN V., POPOOLA B. (1972): Pneumococci producing β-hemolysis on agar. Appl.Microbiol., 24, p.44.

WANNAMAKER L.W. (1970): Group A Streptococcus. Zbl.Bakt.,I.Abt. Orig., 214, pp.293-297.

Capitolul 12

BERGER U. (1963): Die anspruchlosen Neisserien. Ergeb.Mikrobiol. Immunitätsforsch.exp.Therap., 36, pp.97-167.

PEACOCK W.L., WELCH B.G., MARTIN J.E.Jr., THAYER J.D. (1968): Fluorescent antibody technique for identification of presumptively positive gonococcal cultures. Publ.Hlth Rep., 83,

pp. 337-339.

Capitolul 13

BROWN C., SEIDLER R.J. (1973): Potential pathogens in the environment: Klebsiella pneumoniae, a taxonomic and ecological enigma. Appl.Microbiol., 25, pp. 900-904.

FALLON R.J. (1973): The relationship between the biotype of Klebsiella species and their pathogenicity. J.clin.Path., 26, pp.523-528.

RUSU V. (1970): Yersinia enterocolitica în patologia umană. Microbiologia (Bucureşti), 15, pp.11-38.

Capitolul 14

GARDNER P., GRIFFIN W.B., SWARTZ M.N., KUNZ L.J. (1970): Nonfermentative gram-negative bacilli of nosocomial interest. Amer.J.Med., 48, pp. 735-749.

PEDERSEN M.M., MARSO M.A., PICKETT M.J. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. Am.J.Clin.Path., 54, pp. 178-192.

PICKETT M.J., MANCLARK C.R. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. I. Nomenclature. Am.J.Clin.Path., 54, pp. 155-163.

PICKETT M.J., PEDERSEN M.M. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. II. Detection and identification. Am.J.Clin.Path., 54, pp. 164-167.

Capitolul 16

BARKSDALE L. (1970): Corynebacterium diphtheriae and Its Relatives. Bact.Rev., 34, pp. 378-422.

GRAY M.L., KILLINGER H.H. (1966): Listeria monocytogenes and Listeric Infections. Bact.Rev., 30, pp.309-382.

MEITERT E., SARAGEA A. (1967): Utilizarea mediului Tinsdale în diagnosticul bacteriologic al difteriei. Microbiologia (Bucureşti), 12, pp. 361-368.

Capitolul 17

MOUSTARDIER G. (1972): Bactériologie Médicale, Librairie Maloine, Paris, capitolul 9.

Capitolul 18

ARDELEANU J., TEODORESCU I. (1974): Studiul unei tulpini de Clostridium tetani izolată de la un caz de avort septic. Microbiologia (București), 19, pp. 137-142.

Capitolele 19 și 20

SCHOUTENS E., YOURASSOWSKY (1974): Septicémies à Bacteroides fragilis. Gaz.Méd. France, 81, pp. 1363-1372.

WILSON W.R., MARTIN W.J., WILKOWSKE C.J., WASHINGTON J.A. (1972): Anaerobic bacteremia. Mayo Clin. Proceedings, 47, pp. 639-646.

ZBRANSKY R.J. (1970): Isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. Mayo Clin. Proceedings, 45, pp.256-263.

Capitolul 21

ALGEORGE G., BOMBANESCU V. (1965): Investigația bacteriologică în cadrul depistării și combaterii tuberculozei, în vol. Elemente de combatere și eradicare a tuberculozei, ed.de Bulla Al., Ed.Medicală, București, pp. 192-249.

DELBRUYNE J. (1971): Bactériologie et classification des infections humaines à mycobactéries. Gaz.Med. France, 78, pp. 1305-1316.

KUBICA G.P. (1973): Diferential identification of Mycobacteria VII. Key features for identification of clinically significant Mycobacteria. Am.Rev.Resp.Dis., 107, pp. 9-18.

STOKES E.J. (1968): Clinical Bacteriology, ed.III-a, E.Arnold, London, pp. 146-159.

Capitolul 22

O.M.S. (1967): Sér.rapp.techn. No.380. Problèmes actuels des recherches sur la leptospirose, Génève.

O.M.S. (1970): Sér.rapp.techn. No.455. Recherches sur les tréponé-

matoses, Génève.

SPARLING P.F. (1971): Diagnosis and treatment of syphilis. N.Engl.J.Med., 284, pp.642-654.

Capitolul 23

ALUALTO B.B., WITTLER R.G., WILLIAMS C.O., FABER J.E. (1970): Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. International J.of Syst.Bact., 20, pp. 35-58.

PEROL I., LATRILLE J. (1975): Diagnostic biologique des infections humaines à mycoplasmes. Med.Mal.Inf., 5, pp. 265-276.

SOLOMON F., CASPI E., BUKOVSKY I., SOMPOLINSKY D. (1973): Infections associated with genital Mycoplasma. Am.J.Obstet. Gynec., 116, pp. 785-792.

PARTEA A SASEA

Manuale şi tratate consultate pentru capitolele 24-33

BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, Saint Louis, capitolele 6-15.

BLAIR J.E., LENNETTE E.H., TRUANT J.P. (1971): Manual of Clinical Microbiology, Am.Soc.Microbiol, Bethesda, capitolele 2 ...

BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A. (1969): Manuel de Techniques Bactériologiques, ed.III-a, Ed. Flammarion, Paris, partea 2-a, capitolele 1-1o, 14.

ROSEBURY T. (1962): Microorganisms Indigenous to Man, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

STOKES E.J. (1968): Clinical Bacteriology, ed.III-a, E.Arnold, London, capitolele 3,4,6.

WEISCH M. (1965): Cum interpretăm analizele bacteriologice şi probele de sensibilitate la antibiotice, Ed.Medicală, Bucureşti.

Capitolul 24

BODILY H.L. (1970): General Administration of the Laboratory, în Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections ed.de Bodily H.L., Updyke E.L., Mason J.O., Am. Public Hlth Assoc., Inc., New York, capitolul 1.

CARY S.G., BLAIR E.B. (1964): New transport medium for shipment of clinical specimens. J.Bact., 88, pp. 96-98.

STUART R.D. (1959): Transport medium for specimens in public health bacteriology. Publ.Hlth Rep., 74, pp. 431-438.

Capitolul 25

BARTLETT R.C. (1974): A plea for clinical relevance in medical microbiology. Am.J.Clin.Path., 61, pp. 867-872.

BILBIIE VL. (1972): Delimitări biologice şi ecologice în conceptul de patogenitate condiţionată. Microbiologia (Bucureşti), 17, pp. 5-14.

DUCA E., BUIUC D. (1970): Bacterii potenţial patogene. Rev.Med. Chir.(Iaşi), nr.3, pp. 767-777.

DUCA E. (1971): Valoarea practică a reacţiilor serologice în diagnosticul bolilor infecţioase. Viaţa Medicală, 18, pp.1o45-1o52.

DUCA E. (1972): Factori şi mecanisme care favorizează apariţia infecţiilor cu bacterii şi fungi condiţionat patogeni. Microbiologia (Bucureşti), 17, pp. 23-3o.

POPOVICI M. (1972): Bacterii cu patogenitate condiţionată. Probleme ale diagnosticului de laborator. Criterii de diferenţiere. Ibid., pp. 15-22.

Capitolul 26

BENNETT I.L., PETERSDORF R.G. (1971): An approach to infectious diseases, în Harrison's Principles of Internal Medicine, ed.VI-a, Mc Grow-Hill Book Company, New York, capitolul 132.

CLUFF L.E., FEKETY F.R. (1971): Bacterial endocarditis, ibid., capitolul 137.

ROSENFELD M.G. (1971): Mannual of Medical Therapeutics, ed.XX-a,

Little Brown & Company, Boston, pp. 247-248.

Capitolul 27

DUCA E., BERNESCU E., BUIUC D., BIRZU A., NICULESCU N., PAPALICEFF ST., NITESCU S. (1974): Primary sensitivity tests as a method for the isolation of organisms în polybacterial specimens/experimented in burn wounds. Rev.Med.Chir. (Iaşi), nr.1, pp. 85-9o.

ROE E., JONES R.J., LOWBURY E.J.L. (1971): Transfer of antibiotic resistance between Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, and other gram-negative bacilli in burns. Lanvet, 1, pp. 149-152.

ROSEMBLATT J.E., FALLON A., FINEGOLD S.M. (1973): Comparison of methods for isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. Appl.Microbiol., 25, pp. 77-85.

Capitolul 28

COONROD J.D., RYTEL M.W. (1973): Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunelectrophoresis. I. Methodology and immunologic properties of pneumococcal antigens. J.Lab.Clin.Med., 81, pp. 770-777.

DUCA E. (1967): Explorarea microbiologică a lichidului cefalorahidian. Viaţa Medicală, 14, pp. 11o7-112o.

GREENWOOD B.M., WHITTLE H.C., DOMINIC-RAJKOVIC O. (1971): Countercurrent immunelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. Lancet, 2, 519-521.

KOSTYUKOVA N.N. (1975): Diagnosticul microbiologic al infecţiilor meningococice. Microbiologia (Bucureşti), 20, pp.245-248.

SMITH AL. (1973): Diagnosis of bacterial meningitis. Pediatrics, 52, pp. 589-592.

Capitolul 29

DUCA E., BUIUC D. (1976): Aportul laboratorului de microbiologie în investigaţia reno-urinară. Examenul bacteriologic al urinii. Microbiologia (Bucureşti), 21, sub tipar.

Capitolul 30

BELLIVEAU R.R. (1973): Normal vs patogenic flora in acute pharingitis. N.Engl.J.Med., 288, 797.

KAPLAN E.L., TOP F.H.Jr., DUDDING B.A., WANNAMAKER L.W. (1971): Diagnosis of streptococcal pharingitis: differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child. J.Inct.Dis., 123, pp. 49o-5o2.

MIHALCU F. (1969): Diagnosticul de laborator al infecţiilor cu streptococ β-hemolitic. Microbiologia (Bucureşti), 14, pp. 459-468.

SARAGEA A., MEITERT E., MAXIMESCU P. (1967): Unele modificări ale metodei de diagnostic bacteriologic în difterie. Microbiologia (Bucureşti), 12, pp. 369-376.

Capitolul 31

BARTLETT R.C. (1974): A plea for clinical relevance in medical microbiology. Am.J.Clin.Path., 61, pp.867-872.

HOEPRICH P.D. (1970): Etiologic diagnosis of lower respiratory tract infections. Californ.Med., 112, pp. 1-8.

KALINSKE R.W., PARKER R.H., BRANDT D., HOEPRICH P.D. (1967): Diagnostic usefulness and safety of transtracheal aspiration. N.Engl.J.Med., 276, pp. 6o4-6o8.

KESTLE D.G., KUBICA G.P. (1967): Sputum collection for cultivation of mycobacteria. Am.J.Clin.Path., 48, pp. 347-349.

MUFSON M.A., KRAUSE H.E., MOCEGA H.E., DAWSON F.W. (1970): Viruses, Mycoplasma pneumoniae and bacteria associated with lower respiratory tract disease among infants. Am.J.Epidem., 91, pp. 192-2o2.

PECORA D.V. (1963): A comparison of transtracheal aspiration with other methods of determining the bacterial flora of the lower respiratory tract. N.Engl.J.Med., 269, pp. 664-666.

SEFER M., TATARU V., SZEGLI L., NEGUT M., STOICA V. (1971): Microorganismele izolate din secreţia bronşică şi semnificaţia lor. Microbiologia (Bucureşti), 16, pp. 531-538.

Capitolul 32

DU PONT H.L., FORMAL S.B., HORNIK R.B., SNYDER M.J., LIBONATI J.P., SHEAHAN D.G., LA BREC E.H., KALAS J.P. (1971): Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. N.Engl.J.Med., 285, pp. 1-9.

FLORESCU D.P. (1974): Noi agenţi etiologici ai enteritelor dizenteriforme. Teză de doctorat, I.M.F. Bucureşti.

JOSAN R., BILCEA M., SUCIU O., GAVRILA I. (1970): Rolul germenilor potenţial patogeni în enteritele copiilor. Microbiologia (Bucureşti), 15, pp. 333-338.

POPOVICI M., SZEGLI L., GEORGESCU C., NACESCU N., DUMITRESCU R. (1973): Importanţa diagnosticului etiologic în tulburările intestinale acute (boala diareică). Microbiologia (Bucureşti), 18, pp. 359-364.

SERBAN D., IVANOF A., MUNTEANU I. (1973): Rolul klebsielei în enterita copilului în relaţie cu cantitatea de germeni. Microbiologia (Bucureşti), 18, pp. 2o3-21o.

Capitolul 33

CIUCA T. (1972): Leucoreea la fetiţe şi la pubertate. Obstetr. Ginecol., 2o, pp. 453-467.

DUMKELBERG W.E. (1965): Diagnosis of Haemophilus vaginalis vaginitis by gram-stained smears. AmJ.Obstet.Gynec., 91, pp. 998-1ooo.

GORBACH S.L., MENDE K.B., THADEPALLI H., KEITH L. (1973): Anaerobic microflora of the cervix in healthy women. Am.J. Obstet.Gynec., 117, pp. 1o53-1o55.

SWEET R.L., LEDGER W.J. (1973): Puerperal infections morbidity. Am.J.Obstet.Gynec., 117, pp. 1o93-11oo.

./.

79-84
886

1. Principalii constituanți ionici ai plasmei sanguine ~~Na coltul~~

Na^+ = limite normale - 135 - 155 mEq/l

K^+ = -"- 3,5 - 5,5 mEq/l

Ca (total) -"- 4,5 - 5,5 mEq/l (Ca^{2+} (ionic) ≈ 50% din cel total)

Mg^{2+} -"- 1,5 - 2,9 mEq/l

Cl^- -"- 98 - 108 mEq/l

In laboratorul nostru, determinarea Na și K se face prin fotometria cu flacără; Ca și Clorul prin titrare, iar magneziul prin dozare colorimetrică cu galben de titan.

Tulburările hidroelectrolitice sînt dezordini acute cu, sau fără substrat patologic care, provin prin carență sau exces.

Na+; **crește** - în ciroză hep, nefroză, insuficiență cardiacă

scade - în diaree, vărsături, insuficiență renală pancreatită

K+ = **crește** - insufic. renală, șocul hemoragic și traumatic;

scade - stenoză pilorică, cetoză diabetică

Ca = **crește** - hiperparatiroidism, carcinom, hipervitaminoză - D;

scade = Boala celiacă, insufic. renală, pancreatită acută, hipoparatiroidism